

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**TRANSPORTE DE MIR-382 CIRCULANTE VÍA EXOSOMAS EN EL  
SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL NORESTE DE  
MÉXICO**

**PRESENTA**

**QFB. GUILLERMO ENRIQUE RAMÍREZ GARZA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

**JULIO, 2018**

**TRANSPORTE DE MIR-382 CIRCULANTE VÍA EXOSOMAS EN EL  
SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL NORESTE  
DE MÉXICO**

**Comité de Tesis**

---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**  
**Director**

---

**Dra. Cristina Rodríguez Padilla**  
**Secretario**

---

**Dra. Vianey González Villasana**  
**Vocal**

---

**Dr. Fermín Mar Aguilar**  
**Vocal**

---

**Dr. Jorge Armando Verduzco Martínez**  
**Vocal**

**TRANSPORTE DE MIR-382 CIRCULANTE VÍA EXOSOMAS EN EL  
SUERO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL NORESTE  
DE MÉXICO**

**Dirección de Tesis**

---

**Dra. Diana Reséndez Pérez**

**Director**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, al posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas y en especial al Laboratorio de Inmunología y Virología por permitirme ser un integrante más de sus institución.

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, quien fue mi primer contacto en la maestría y quien me dirigió con la Dra. Diana Reséndez Pérez a quien igualmente le estoy agradecido por todo su apoyo y consejos en el desarrollo de la maestría y de la tesis.

Agradezco al Dr. Roberto Mercado Hernández por su orientación en el desarrollo del análisis estadístico de esta tesis.

Agradezco al Dr. Fermín Mar Aguilar, la Dra. Vianey González Villasana y al Dr. Jorge Verduzco Martínez, integrantes de mi comité de tesis que me apoyaron y orientaron con el desarrollo de esta tesis.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo y patrocinio para la realización de este proyecto y tesis.

## DEDICATORIAS

Le dedico mi tesis a:

### ***Mi padre y mi madre***

Que siempre están ahí para apoyarme en lo necesario y con quienes puedo contar cuando los necesite. Gracias a su paciencia y sus consejos es que he llegado a donde estoy parado ahora mismo.

### ***Mis hermanos***

Con quienes siempre pude charlar sobre la maestría para aliviar algo de la tensión y evaluar otros puntos de vista.

### ***Mi sobrina Génesis***

Que a pesar de aún ser muy pequeña y no saber nada de mi tesis, siempre está ahí para hacerme sonreír, jugar conmigo y llenarme de alegría, empujándome a querer ser mejor

### ***Mi novia Cindy***

Con quien mucho charlé de la tesis a pesar de que ella me entendía poco y nada y que siempre me escuchó y me ayudó a debatir sobre las opciones que tenía

### ***Mis amigos y compañeros***

Ya sea en la maestría o fuera de ella, ayudando a pasar un buen rato y charlando sobre las opciones de investigación del presente y del futuro.

### ***Mis maestros***

Un número enorme de profesionales en la educación e investigación que me ayudaron a forjar mis ganas por estudiar y quienes alimentaron mi curiosidad con sus conocimientos. Gracias a ellos nació mi interés por la ciencia y la investigación.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1.0 Cáncer	3
2.2.0 Cáncer de mama	4
2.3.0 Clasificación del cáncer de mama	6
2.3.1 Clasificación histológica	6
2.3.2 Clasificación TNM	7
2.3.3 Diagnóstico de Cáncer de Mama	9
2.4.0 MicroRNAs	10
2.4.1 El descubrimiento de los microRNAs	10
2.4.2 Biogénesis y función de microRNAs	11
2.5.0 MicroRNAs en cáncer	13
2.6.0 MicroRNAs en cáncer de mama	14
2.6.1 Iniciadores de la tumoración	14
2.6.2 Resistencia al Tratamiento	15
2.6.3 Metástasis	16
2.7.0 MicroRNAs como biomarcadores	16
2.8.0 MicroRNA-382 y cáncer de mama	17
2.9.0 Transportadores de microRNAs	19
2.9.1 Exosomas	20
2.9.1.1 Función de los Exosomas	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>4. HIPÓTESIS</b>	24
<b>5. OBJETIVOS</b>	25
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	26
6.1. Estrategia Experimental	26
6.2. Requerimiento de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama	27
6.3. Curva de eficiencia de miR-16 como primer normalizador	28
6.4. Detección y cuantificación del miR-382 aislado de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas	30
6.5. Aislamiento de exosomas a partir de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas	32
6.6. Caracterización de exosomas	32

6.7. Extracción de RNAs pequeños de exosomas.....	33
6.8. Análisis de pureza de RNAs pequeños exosomales en Bioanalyzer.....	34
6.9. Detección y cuantificación del miR-382 exosomal aislado de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas.....	35
6.10. Análisis Estadístico.....	36
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
7.1 Detección y cuantificación de miR-382 en suero de mujeres con cáncer mamario.....	37
7.1.1 Curva de eficiencia del normalizador endógeno microRNA-16.....	37
7.1.2 Detección del microRNA-382 en el suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas.....	38
7.1.3 Cuantificación relativa de microRNA-382 en el suero .....	41
7.1.4 Distribución no normal de la expresión de microRNA-382 en suero .....	42
7.2 Detección del miR-382 en exosomas aislados del suero de pacientes con cáncer mamario .....	42
7.2.1 Aislamiento y caracterización de exosomas .....	43
7.2.2 Pureza de RNAs pequeños aislados de exosomas.....	44
7.2.3 Amplificación del microRNA-382 exosomal obtenido de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas .....	45
7.2.4 Cuantificación relativa del microRNA 382 exosomal en muestras de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas .....	48
7.2.5 Distribución no normal del microRNA-382 exosomal .....	48
7.3 Asociación del miR-382 circulante y exosomal con las características clinopatológicas de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas provenientes del Noreste de México.....	49
7.3.1 Asociación del miR-382 en suero con el cáncer de mama ductal.....	49
7.3.2 Asociación del miR-382 exosomal con el cáncer de mama ductal.....	50
7.3.3 Asociación de miR-382 en suero con los estadios del cáncer de mama ductal.....	51
7.3.4 Asociación de miR-382 en suero con los estadios del cáncer de mama ductal.....	52
7.3.5 Asociación de miR-382 en suero con la edad .....	53
7.3.6 Asociación de miR-382 exosomal con la edad .....	55
7.3.7 Asociación del cáncer con un nivel bajo/alto de miR-382 en suero .....	55
7.3.8 Asociación del cáncer con un nivel bajo/alto de miR-382 en exosomas .....	57
7.3.9 Asociación de miR-382 en suero con la invasión de nodos linfáticos .....	58
7.3.10 Asociación de miR-382 exosomal con la invasión de nodos linfáticos .....	59
7.3.11 Asociación de las variables clinicopatológicas con el nivel alto/bajo de miR-382 detectado en suero.....	60

7.3.12 Asociación de las variables clinicopatológicas con el nivel alto/bajo de miR-382 detectado en exosomas.....	61
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>69</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>
<b>12. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO.....</b>	<b>78</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del cáncer según el sistema TNM .....	8
Tabla 2. Criterios para la toma de muestras de suero .....	27
Tabla 3. Master mix para transcripción reversa .....	29
Tabla 4. Temperaturas para transcripción reversa .....	29
Tabla 5. Master Mix para qPCR .....	30
Tabla 6. Master Mix para transcripción reversa.....	31
Tabla 7. Temperaturas para transcripción reversa .....	31
Tabla 8. Master Mix para qPCR .....	31
Tabla 9. Mix de PolyAdenilación .....	35
Tabla 10. Mix de cDNA.....	35
Tabla 11. Mix de qPCR .....	35
Tabla 12. Temperaturas para transcripción reversa .....	36
Tabla 13. Cálculo de eficiencia de amplificación de miR-16 mediante el método de Livak.....	37
Tabla 14. Ciclos de amplificación de microRNA-382 en suero .....	39
Tabla 15. Promedios de ciclos de amplificación de miR-382.....	40
Tabla 16. Niveles de expresión de miR-382 calculadas mediante el método de Livak .....	41
Tabla 17. Ciclos de amplificación (CTs) del microRNA-382 exosomal .....	46
Tabla 18. Promedio de CT del miR-382 exosomal.....	47
Tabla 19. Niveles de expresión de miR-382 calculadas mediante el método de Livak .....	48
Tabla 20. Asociación de miR-382 en suero con las variables clinopatológicas .....	60
Tabla 21. Asociación de miR-382 exosomal con las variables clinopatológicas.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos más comunes de cáncer a nivel mundial. ....	3
Figura 2. Niveles de mortalidad asociada a distintos tipos de cáncer a nivel mundial. ....	4
Figura 3. Imagen lateral de las mamas que muestra su composición anatómica. ....	4
Figura 4. Tasa anual de mortalidad de mujeres con cáncer mamario en México. ....	5
Figura 5. Tasa estatal de mortalidad de mujeres con cáncer mamario en México. ....	6
Figura 6. Progresión histológica del cáncer ductal. ....	7
Figura 7. Ruta biosintética de los microRNAs. ....	12
Figura 8. Sobreexpresión de miR-382 en suero de pacientes con cáncer mamario. ....	19
Figura 9. Transportadores de microRNAs. ....	20
Figura 10. Representación morfológica de un exosoma. ....	21
Figura 11. Curva de amplificación de miR-16. ....	37
Figura 12. Distribución de datos de miR-382 aislado de suero. ....	42
Figura 13. Caracterización de exosomas aislados de muestras de suero con cáncer de mama ...	43
Figura 14. Aislamiento de microRNAs exosomales. ....	44
Figura 15. Distribución de datos de miR-382 aislado de exosomas. ....	49
Figura 16. Detección del miR-382 en suero de pacientes con cáncer mamario y personas sanas .....	50
Figura 17. Detección de miR-382 exosomal en pacientes con cáncer mamario y personas sanas .....	50
Figura 18. Detección de miR-382 en el suero de los diferentes estadios de cáncer de mama. ....	51
Figura 19. Detección de miR-382 en suero en estadios tempranos y tardíos de cáncer de mama .....	52
Figura 20. Detección de miR-382 exosomal en los diferentes estadios de cáncer de mama. ....	53
Figura 21. Detección de miR-382 exosomal en estadios tempranos y tardíos de cáncer de mama .....	53
Figura 22. Transporte de miR-382 en suero según la edad de las pacientes de cáncer de mama .....	54
Figura 23. Transporte de miR-382 exosomal según la edad de las pacientes de cáncer de mama .....	55
Figura 24. Detección alta y baja de miR-382 en suero de pacientes con cáncer de mama .....	56
Figura 25. Detección alta y baja de miR-382 exosomal en pacientes de cáncer de mama .....	58
Figura 26. Detección de miR-382 en pacientes y su relación con nodos linfáticos. ....	59
Figura 27. Detección de miR-382 exosomal en pacientes y su relación con nodos linfáticos. ....	59

## **LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

CaMa: Cáncer de mama

miR: microRNA

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativo

CEAMEG: Centro de Estudios para el Adelanto de las Mujeres y la Equidad de Género

AFM: Microscopía de Fuerza Atómica

RNAsa: Enzima que posee la capacidad de degradar RNA

Ago: Argonauta

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

RNA: Ácido Ribonucleico

UTR: Región no traducida

RISC: Complejo inductor de silenciamiento de RNA

NGS: Secuenciación de nueva generación

GTP: Guanosín Trifosfato

ATP: Adenosín Trifosfato

EMT: Transición epitelial a mesenquimal

RERG: Relacionado a Ras y al inhibidor de crecimiento regulado por estrógeno

SSA: Secretaría de salud

TNM: Tumor-Nodo linfático-Metástasis

DROSHA: Ribonucleasa de RNA de doble cadena

XPO5: Exportina 5

DICER1: Endoribonucleasa de RNA de doble cadena

OncomiRs: MicroRNA oncogénico

CSC: Células iniciadoras de tumores

## RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que presenta múltiples puntos de regulación dentro de los cuales la expresión de los microRNAs cumple un papel fundamental. Además de inhibir la traducción de RNAs a proteína, los microRNAs son capaces de utilizar mecanismos de transporte como los exosomas para migrar a otros órganos y sistemas transportando así proteínas, RNA y microRNAs. Previamente en nuestro laboratorio se detectó la secreción de ocho microRNAs en suero de pacientes con CaMa, de los cuales se mostró el potencial de los microRNAs 145, 155 y 382 como biomarcadores para la distinción entre pacientes con CaMa y personas sanas. En ésta tesis se seleccionó miR-382 ya que actúa como oncomiR en cáncer de mama y se desconoce el sistema de transporte que utiliza así como si el nivel de detección de este microRNA está asociado con los estadios del cáncer mamario. Para ello, se determinó el transporte de miR-382 vía exosomas y su asociación con las variables clinopatológicas del cáncer mamario en mujeres del Noreste de México. La estrategia experimental consistió en la cuantificación del miR-382 en muestras de suero de 20 pacientes con cáncer mamario y 5 personas sanas mediante qRT-PCR. Del suero de las pacientes se aislaron y caracterizaron los exosomas para posteriormente cuantificar los niveles de miR-382. Así mismo, se analizó la asociación entre el nivel de miR-382 en suero y exosomas con las variables clinopatológicas del cáncer. Los resultados obtenidos corroboraron la presencia de miR-382 en el suero de las pacientes así como su transporte vía exosomas aislados del el suero de pacientes con CaMa y pacientes sanas. El nivel de expresión de miR-382 no se encontró asociado a los estadios de CaMa, a la presencia del cáncer o a la invasión de nodos linfáticos. Los resultados obtenidos permiten concluir que el microRNA-382 se transporta vía exosomas tanto en pacientes con cáncer como en personas sanas pero no presenta asociación con las variables clinopatológicas del cáncer analizadas. Las muestras analizadas fueron obtenidas de pacientes que presentaban un régimen terapéutico que podría afectar los niveles de miR-382 detectados por lo que se sugiere incluir pacientes sin tratamiento así como analizar un mayor número de muestras, además de estudiar otros transportadores de microRNAs como las proteínas argonauta y las moléculas HDL.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por una división celular sin control con la posibilidad de invadir otros tejidos y puede desarrollarse por antecedentes familiares, mutaciones genéticas, factores ambientales, estrés, edad, estilo de vida entre otros (de la Cruz *et al.* 2014). Uno de los tipos de cáncer que más destaca en el mundo es el cáncer de mama ya que es la segunda causa de muerte por neoplasia a nivel mundial y la primera causa en mujeres. En México la tasa de mortalidad se ha incrementado pues en el año 2012 correspondía a 17.2 por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años y en el año 2013 en los estados del noreste del país, Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas, la tasa de mortalidad fue de 21.8, 23.8 y 18.3 respectivamente, por cada 100,000 mujeres mayores de 25 años (CEAMEG, México 2012). Entre los métodos de diagnóstico y prevención más comunes del cáncer de mama se encuentran la mamografía, ultrasonido, autoexaminación manual, examen manual clínico e imagen por resonancia magnética (MRI). Además de estos, se utilizan métodos moleculares de detección de los niveles de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y el receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) (Allison 2012). Estas herramientas se utilizan con frecuencia en la detección y clasificación del cáncer de mama, sin embargo, algunos de estos métodos de detección no son suficientemente sensibles para detectar el cáncer mamario en sus etapas más tempranas. Debido a esto, se requieren alternativas de detección del cáncer, que sean más sensibles y específicas sin la necesidad de ser invasivas. Una de estas opciones es el uso de biomarcadores, como lo es el uso de Oncotype DX (Genomic Health Inc., San Francisco) o el uso de MammaPrint (Agendica, Inc., Irvine, CA) (Allison 2012; Kittaneh *et al.* 2013). Otros biomarcadores potenciales en el diagnóstico del cáncer de mama, son los microRNAs encontrados diferencialmente expresados entre los distintos tipos de neoplasias. En nuestro laboratorio se realizó la búsqueda de nuevos biomarcadores en cáncer de mama, analizando los niveles de expresión de miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155 miR-191 y miR-382 en suero de 61 pacientes con cáncer de mama y 10 controles sanos.

Los resultados obtenidos permitieron discriminar entre pacientes con cáncer mamario y aquellos sin patología maligna. El análisis simultáneo de las curvas ROC de miR-145, miR-155 y miR-382 demostraron una mayor sensibilidad (97.60%), especificidad (100%) y eficiencia (98%) que las combinaciones de otros microRNA (Mar-Aguilar *et al.* 2013). MiR-382 es uno de varios microRNAs que se encuentran sobreexpresados en el suero de mujeres con cáncer mamario. Debido a esto, los tres miRNAs descritos por Mar-Aguilar *et al.* han sido considerados como potenciales biomarcadores moleculares en el Cáncer de Mama. Sin embargo, se desconoce cómo estos microRNAs se secretan al torrente sanguíneo y el mecanismo de transporte de este microRNA así como los niveles de expresión y su asociación con los estadios del cáncer. Los microRNAs disponen de diferentes mecanismos a través de los cuales se transportan en sangre, como lo son el acomplejamiento con proteínas argonauta (Ago1-4), proteínas HDL, exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos. Gracias a estos los microRNAs no son degradados por RNasas activas (Mitchell *et al.* 2008). Los exosomas son vesículas celulares de aproximadamente 30-120 nm secretadas por las células y capaces de transportar proteínas y RNAs pequeños como los microRNAs. Estas vesículas se pueden encontrar en cultivos celulares y en fluidos tales como la saliva, la sangre, la orina y la leche materna, por lo que se les considera un método de comunicación intracelular. Los exosomas presentan diversas moléculas de superficie (CD9, CD63, CD81, CD82, Hsc70, Hsp90) las cuales se utilizan en conjunto con técnicas de microscopia para caracterizarlos y diferenciarlos de otras vesículas celulares (Cheng *et al.* 2013; Vlassov *et al.* 2012). La importancia de los exosomas radica en su papel dentro de los sistemas de comunicación célula-célula, pues transportan RNA capaz de generar proteínas funcionales dentro de otras células (Valadi *et al.* 2007)

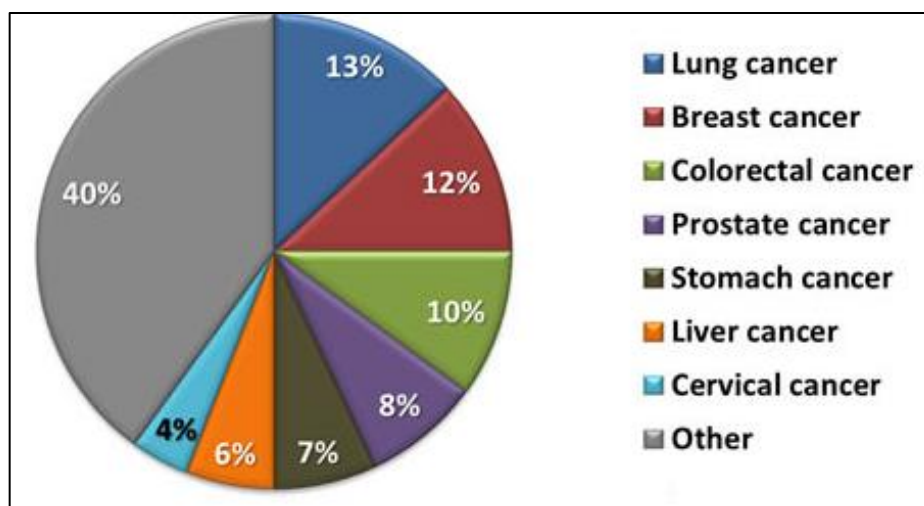
Debido a la importancia de la detección de microRNAs en el suero de las pacientes con cáncer de mama, en ésta tesis se analizó el posible mecanismo molecular de secreción del miR-382 en suero y en los exosomas extraídos de suero de pacientes con cáncer mamario en los diferentes estadios.

## 2. ANTECEDENTES

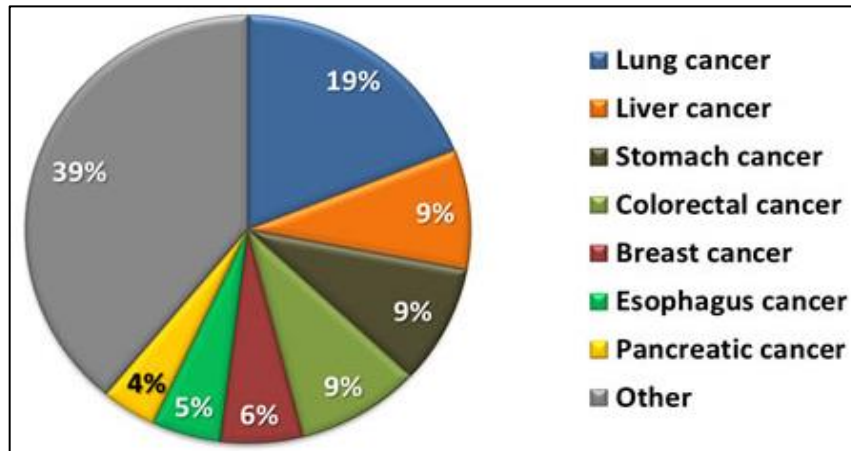
### 2.1.0 Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular no controlado. Estas células además cuentan con la capacidad de invadir otros tejidos, característica que incrementa la mortalidad de este padecimiento. Los factores que están involucrados en el desarrollo del cáncer pueden ser divididos en intrínsecos como inmunosupresión, inflamación crónica, mutaciones genéticas, factores hereditarios y los extrínsecos como la dieta, exposición a sustancias carcinogénicas, agentes infecciosos, radiación (National Cancer Institute, 2015; American Cancer Society, 2015).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) indicó que en el año 2012 se detectaron 14.1 millones de casos nuevos de cáncer y ocurrieron 8.2 millones de muertes debido a esta enfermedad encontrándose como primer causa al cáncer de pulmón y en segundo lugar el cáncer de mama (Figuras 1 y 2)



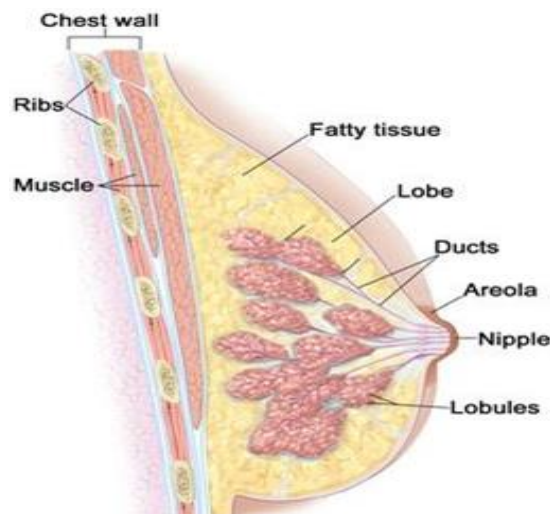
**Figura 1. Tipos más comunes de cáncer a nivel mundial.** El cáncer más común a nivel mundial es el cáncer de pulmón con un 13% del total de casos detectados, seguido del cáncer de mama con 12%, el cáncer colorrectal con 10%, el cáncer de próstata con 8%, el cáncer de estómago con 7%, cáncer de hígado con 6% y cáncer cervical con 4%.  
Tomado de GLOBOCAN 2012



**Figura 2. Niveles de mortalidad asociada a distintos tipos de cáncer a nivel mundial.** El cáncer más común a nivel mundial es el cáncer de pulmón con un 13% del total de casos detectados, seguido del cáncer de mama con 12%, el cáncer colorrectal con 10%, el cáncer de próstata con 8%, el cáncer de estómago con 7%, cáncer de hígado con 6% y cáncer cervical con 4%. Tomado de GLOBOCAN 2012

## 2.2.0 Cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad desarrollada en las células de los tejidos mamarios. Cada una de las mamas posee entre 15 y 20 secciones llamadas lóbulos, las cuales a su vez se subdividen en lobulillos, siendo estos donde se produce la leche materna. Los lóbulos y lobulillos están conectados por pequeños tubos llamados ductos (Figura 3).



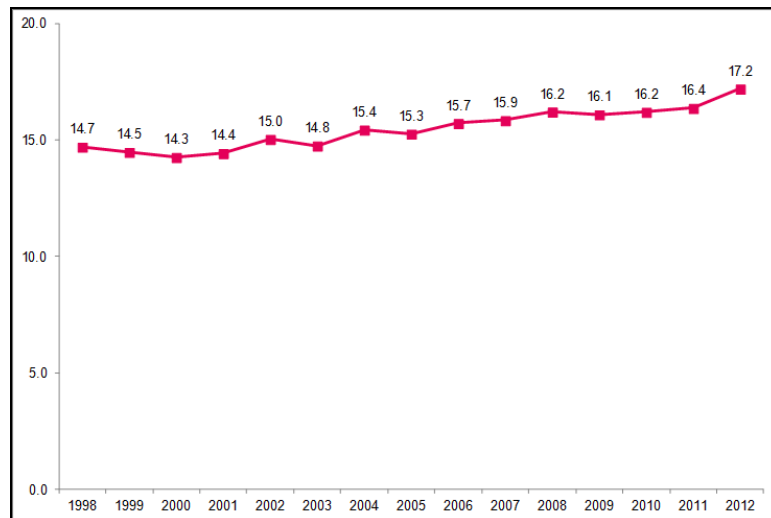
**Figura 3. Imagen lateral de las mamas que muestra su composición anatómica.** En la imagen se muestra la anatomía de los tejidos mamarios sanos, compuestos por las costillas, músculo, tejido graso, lóbulos compuestos por lobulillos, ductos que guían los lóbulos hacia la areola y el pezón.

Tomado de National Cancer Institute.



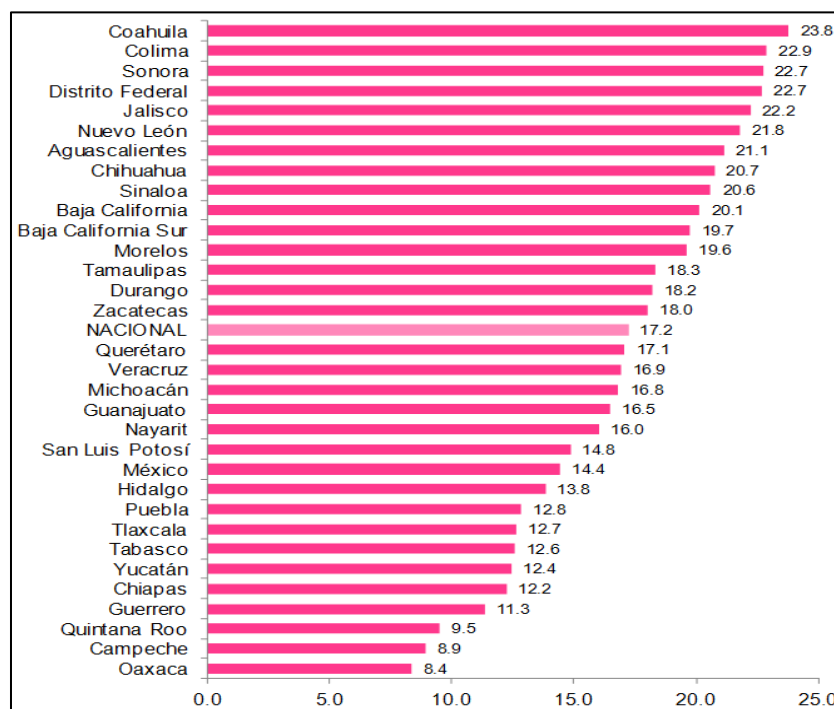
El cáncer de mama es a nivel mundial el tipo de cáncer más detectado en mujeres y como tal, se encuentra entre los primeros lugares de mortalidad. Estadísticas de los Estados Unidos muestran que en el año 2016 se detectaron 246,660 nuevos casos de cáncer de mama lo que equivale al 29.23% del total de casos de cáncer detectados en ese año (843, 820) y se reportaron 40,450 decesos, lo que corresponde al 14.3% del total de muertes asociadas a cáncer (281, 400) (American Cancer Society 2016).

En México el cáncer de mama representa uno de los principales problemas de salud. En el año 2012, se detectaron 8,545 nuevos casos de cáncer de mama, y el mismo año se registraron 5,583 decesos debido al cáncer de mama en mujeres mayores de 25 años, número que demuestra un incremento anual en la tasa de muerte de mujeres con cáncer mamario (Figuras 4 y 5).



**Figura 4. Tasa anual de mortalidad de mujeres con cáncer mamario en México.** En la gráfica se muestra el número estimado de decesos por cada 100 mil mujeres en México a través de los años.

Tomado de SSA, 2016.



**Figura 5. Tasa estatal de mortalidad de mujeres con cáncer mamario en México.** En la gráfica se muestra el número estimado de decesos por cada 100 mil mujeres en los estados de México. Los estados del noreste de México comprenden Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila. Tomado de SSA, 2016.

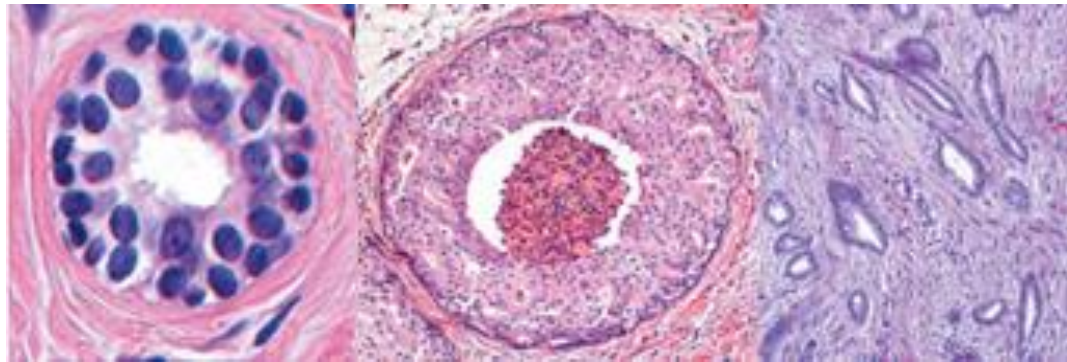
### 2.3.0 Clasificación del cáncer de mama

La clasificación del cáncer mamario describe la extensión o invasión al momento del diagnóstico, lo cual es esencial para determinar la estrategia terapéutica que se debe adoptar. Existen diferentes sistemas de clasificación para el cáncer de mama entre los que podemos encontrar:

#### 2.3.1 Clasificación histológica

El término “carcinoma” es utilizado para describir al cáncer que se deriva de células epiteliales, las cuales recubren el sistema de ductos y glándulas encontradas en las mamas, razón por la cual la mayor parte de las neoplasias en las mamas son carcinomas. La mayor diferencia entre células benignas y aquellas de un carcinoma, es que estas últimas poseen la capacidad de invadir tejido más allá del epitelio. Todos los carcinomas de la mama, tanto invasivos como no invasivos, son clasificados en base a su apariencia

histológica y citológica. Algunas de las características que se reportan son: sitio, tamaño, forma, consistencia, color, relación con la mama adyacente y las estructuras extramamarias, así como el número de focos con apariencia maligna (Shah *et al.* 2014). El término “carcinoma *in situ*” se acuñó hace tiempo para describir a las células epiteliales anormales que no han invadido tejidos cercanos pero al ser vistas bajo el microscopio poseen un gran parecido con células de carcinoma invasivo. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que la transición de tejido normal-carcinoma *in situ*-carcinoma invasivo involucra una serie de cambios moleculares más complejos que solo las características visibles al microscopio. Además de esto, se sabe que no todos los pacientes que poseen un carcinoma *in situ* desarrollan un cáncer invasivo aún y en ausencia de tratamiento. El cáncer de mama puede ser categorizado en carcinoma *in situ* y carcinoma infiltrante o invasivo. El carcinoma *in situ* puede a su vez, ser subclasificado en lobular y ductal. El carcinoma ductal in situ (DCIS) es aquel que se desarrolla en las células de los ductos y posee un mayor índice de prevalencia que el carcinoma lobular in situ (LCIS), el cual se desarrolla en los lóbulos (Malhotra *et al.* 2010; Figura 6).



**Figura 6. Progresión histológica del cáncer ductal.** En la imagen de la izquierda se puede observar la anatomía normal del lumen ductal en las mamas. En la imagen del centro se muestra el desarrollo de un carcinoma ductal *in situ* y en la de la derecha un carcinoma invasivo donde las células perdieron su morfología diferenciada. Tomada de Burstein *et al.* 2004.

### 2.3.2 Clasificación TNM

La clasificación del cáncer por estadios permite conocer la extensión de esta enfermedad en el organismo al momento del diagnóstico. Este conocimiento es esencial para

determinar el tipo de terapia que se utilizará para el tratamiento del cáncer. Existen diferentes tipos de clasificación del cáncer, entre los más utilizados se encuentra el sistema TNM, el cual clasifica el estadio del cáncer dependiendo del tamaño del tumor, el número de nódulos linfáticos que hayan sido invadidos y la presencia/ausencia de metástasis. Una vez que se haya determinado el estadio TNM, se hace una clasificación en fases I, II, III y IV, siendo así la fase I la más temprana y la fase IV la más avanzada (American Cancer Society, 2015).

**Tabla 1. Clasificación del cáncer según el sistema TNM**

<b><i>Estadio</i></b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T0	N1mi	M0
	T1	N1mi	M0
<b>IIA</b>	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
<b>IIB</b>	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
<b>IIIB</b>	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
<b>IIIC</b>	Tx	N3	M0
<b>IV</b>	Tx	Nx	M1

T0: No hay evidencia de tumor, Tis: Tumor *in situ*, T1: Tumor  $\leq 20$  mm, T2: Tumor  $> 20$  mm pero  $\leq 50$  mm, T3: Tumor  $> 50$  mm, T4: Tumor de cualquier tamaño con extensión directa al pecho y/o la piel, Tx: Cualquier T, N0: Sin nódulos linfáticos invadidos, N1: Presencia de células cancerosas en 1-3 nódulos linfáticos auxiliares, N1mi: Micrometástasis de 2 mm o menos en 1-3 nódulos linfáticos auxiliares, N2: Presencia de células cancerosas en 4-9 nódulos linfáticos auxiliares o en 1 o más nódulos linfáticos mamarios, N3: Presencia de células cancerosas en más de 10 nódulos linfáticos auxiliares o presencia de células cancerosas en nódulos linfáticos bajo la clavícula, Nx: Cualquier N, M0: No hay presencia de metástasis, M1: El cáncer se ha diseminado a órganos distantes (ej. Hueso, pulmón, cerebro, hígado)

### 2.3.3 Diagnóstico de Cáncer de Mama

Entre los métodos de diagnóstico y prevención más comunes del cáncer de mama se encuentran: Mamografía, Ultrasonido, Autoexaminación manual, Examinación manual clínica e Imagen por Resonancia Magnética (MRI). Además de estos, se utilizan métodos moleculares de detección de los niveles de Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona y el Receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (HER2) (Allison 2012), así como la detección de los antígenos CA 15.3 y CA 27.29 para la detección de esta neoplasia, sin embargo, la expresión de estas proteínas en suero/plasma no concluye con eficiencia la presencia del cáncer mamario, pues se han encontrado relacionadas a otros procesos neoplásicos, así como otras enfermedades no relacionadas al cáncer (American Cancer Society, 2015).

A pesar de las diferentes herramientas de diagnóstico de las que se disponen, se requieren nuevas alternativas para la detección temprana del cáncer, además de que sean más sensibles y específicas sin la necesidad de ser invasivas. Una de estas opciones, es el uso de biomarcadores, como lo es Oncotype DX, estudio de 21 genes a partir de una biopsia tumoral para determinar la eficacia de la quimioterapia en conjunto con la terapia hormonal cuando el cáncer de mama es receptor de estrógeno positivo (Genomic Health Inc., San Francisco) o el uso de MammaPrint, el cual analiza la actividad de ciertos genes en etapas tempranas del cáncer mamario (Agendica, Inc., Irvine, CA) (Allison 2012; Kittaneh *et al.* 2013). En la actualidad, los microRNAs han sido propuestos como herramienta en el diagnóstico del cáncer de mama, pues estos se encuentran diferencialmente expresados en múltiples procesos neoplásicos (Iorio *et al.* 2005).

## 2.4.0 MicroRNAs

### 2.4.1 El descubrimiento de los microRNAs

Los microRNAs son cadenas sencillas de RNA de entre 19 y 25 pares de bases. El primer microRNA fue descubierto en el año 1993 en el nematodo *C. elegans* gracias a los esfuerzos de los laboratorios de Ambros y Ruvkun, y recibió el nombre de Lin-4. Este fue descubierto gracias a una mutación que afectaba uno de los genes partícipes de la maduración del nematodo. Aquellos nematodos que perdían la función de Lin-4 carecían de estructuras comunes en adultos de su especie, eran incapaces de depositar huevos y desarrollaban estructuras durante estadios larvales inapropiados. Buscando la secuencia de lin-4 en un fragmento de 700 pares de bases no se encontraron codones de inicio y termino convencionales, por lo que se concluyó que el gen de Lin-4 no codificaba para una proteína. Posteriormente se encontraron dos fragmentos productos de la transcripción de este fragmento, uno de 61 pares de bases y otro de 22 pares de bases. Anteriormente se había descubierto que lin-4 regulaba negativamente al gen lin-14, puesto que una mutación de lin-14 inhibía el fenotipo mostrado por los nematodos carentes de lin-4. Al analizar esta interacción, se descubrió que lin-14 era regulado negativamente a nivel postranscripcional y que la región 3' UTR era suficiente para esta regulación y que los fragmentos producto de la transcripción de lin-4 eran los responsables (Almeida *et al.* 2011).

En el año 2000, siete años después del descubrimiento de lin-4, Reinhart y colaboradores descubrieron el segundo microRNA al cual denominaron Let-7, encontrado también en el nematodo *C. elegans*. Al igual que lin-4, let-7 participaba en la maduración de la larva a un estadio adulto y mientras que la pérdida de su función causaba la reaparición de características larvarias aún en el estadio adulto, una sobreexpresión de let-7 generaba una aparición prematura de características de larva adulta. La diferencia más significativa de let-7 y lin-4 es que el primero se encuentra conservado a través de las especies que van desde las moscas hasta los humanos donde let-7 se encontró en órganos como el cerebro, corazón, hígado, pulmones, tráquea, intestino delgado y timo.

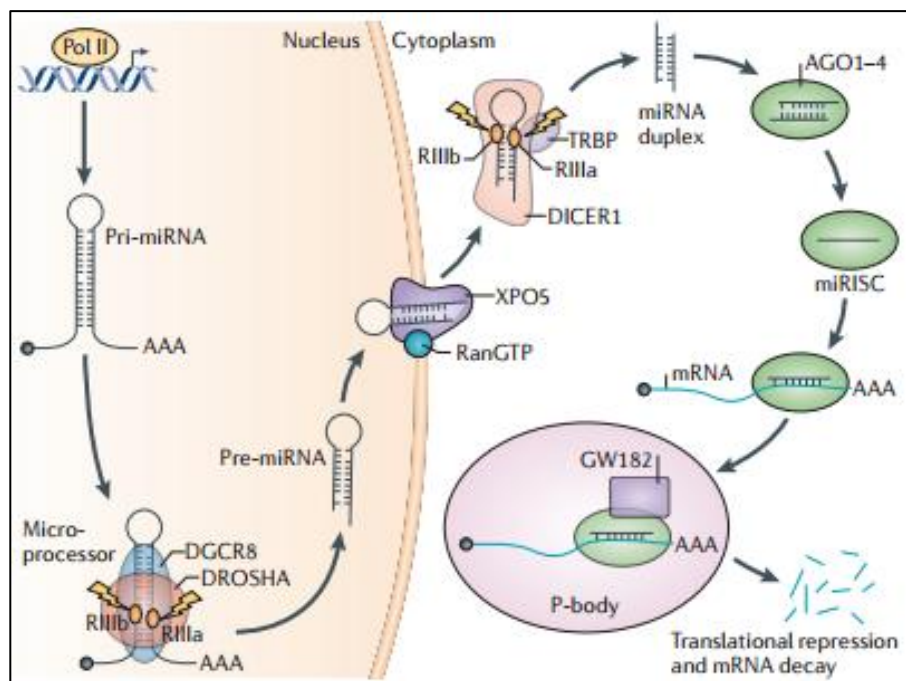
Este descubrimiento aportó gran significancia al estudio de una nueva clase de RNAs pequeños no codificantes, llamados posteriormente “microRNAs” (Bushati y Cohen 2007; Calin y Croce 2006).

#### **2.4.2 Biogénesis y función de microRNAs**

La génesis de microRNAs comienza en el núcleo con la transcripción del ADN por parte de la RNA polimerasa II, generando un fragmento llamado microRNA primario o pri-microRNA, el cual poseerá un cap de 7-metilguanilato en el extremo 5' y una cadena de múltiples adeninas en su extremo 3'. Este fragmento será posteriormente cortado por un microprocesador compuesto de la RNasa de doble cadena III DROSHA y su cofactor DGSCR8, la proteína de unión a RNA de doble cadena de región crítica 8 del síndrome DiGeorge. Este proceso genera una cadena de 60-70 pares de bases llamada pre-microRNA o microRNA precursor el cual adquiere la forma de horquilla y será exportado por el factor de transporte nucleocitoplásmico Exportina-5 y RanGTP el cual prevendrá la degradación del pre-microRNA y llevará acabo su transporte al citoplasma. Una vez que el pri-microRNA se encuentra en el citoplasma, es procesado por el sistema RNasa III DICER1 generando así un fragmento de RNA de doble cadena de entre 17 y 25 pares de bases. En conjunto con la enzima DICER1, la proteína TRBP funciona como puente de unión entre la ribonucleasa y las proteínas argonauta al momento de formar el complejo inductor de silenciamiento de microRNA o RISC. En el ser humano, existen diferentes tipos de complejos RISC, que se basan en el tipo de proteína argonauta que está unida, que va de la proteína argonauta 1 a la 4. Entre las proteínas argonauta en el humano, solo la proteína argonauta 2 cuenta con la capacidad de cortar el RNAm, sin embargo, las 4 proteínas argonauta pueden asociarse a microRNAs y participar en el proceso de silenciamiento.

Una de las 2 cadenas de microRNA será cargada en el complejo miRISC, la cual se denominará cadena guía y es esta quien dirigirá el complejo de silenciamiento a un RNAm mediante la complementariedad de 2-8 pares de bases ubicados en el extremo 5' del microRNA, sitio llamado “región semilla”, con la región 3'UTR del RNAm.

Dependiendo del grado de complementariedad entre el microRNA y el RNAm es como se determina el mecanismo de silenciamiento. El corte y degradación del RNAm blanco mediado por argonauto 2 es favorecido cuando se presenta una complementariedad perfecta, proceso común en plantas, mientras que la inhibición de la traducción del RNAm blanco solo requiere una complementariedad moderada o parcial. La interacción miRISC-RNAm se lleva a cabo dentro de los cuerpos de procesamiento o cuerpos P, ya sea que se inhiba la traducción o se degrade el RNAm (Inui *et al.* 2010; Lin y Gregory 2015; MacFarlane y Murphy 2010a; Figura 7).



**Figura 7. Ruta biosintética de los microRNAs.** La RNA polimerasa II genera una cadena sencilla denominada miRNA primario el cual se procesa por las enzimas DGCR8 Y DROSHA para generar un fragmento denominado miRNA-precursor. El pre-miRNA es exportado fuera del núcleo mediante la exportina XPO5 para ser procesado por la enzima DICER1 y generar el miRNA dúplex. Una de las cadenas del miRNA dúplex se acompleja a la proteína argonauto para generar el complejo miRISC, el cual se interactúa con RNAs mensajeros para degradarlos dentro de los cuerpos de procesamiento.

Tomado de Lin y Gregory 2015.

El conocimiento actual sobre los microRNAs señala su capacidad de unirse al RNAm y regular negativamente su expresión. Puesto que la interacción microRNA-RNAm se lleva a cabo a través de solo algunos pares de bases, un solo microRNA es capaz de regular múltiples RNAm mientras que al mismo tiempo, múltiples microRNAs son capaces de regular un solo RNAm. Existen 2 tipos de silenciamiento, la degradación del



RNA<sub>m</sub> y la inhibición de la traducción, lo cual puede definirse también como silenciamiento dependiente de corte y silenciamiento independiente de corte. Ambos mecanismos conllevan al mismo resultado, es decir, una regulación negativa del RNA<sub>m</sub>, sin embargo, a diferencia de la regulación dependiente de corte, la regulación independiente de corte es reversible puesto que el RNA<sub>m</sub> puede ser traducido al eliminar la represión de su traducción (MacFarlane y Murphy 2010b).

### **2.5.0 MicroRNAs en cáncer**

La desregulación de los microRNAs se puede llevar a cabo a través de distintos mecanismos entre los que encontramos la delección, mutación, amplificación así como la desregulación de factores de transcripción que interactúan con microRNAs. Se ha encontrado una expresión alterada de microRNAs en gran variedad de neoplasias, donde el primer reporte que relaciona los microRNAs con el cáncer data del año 2002, cuando Calin y colaboradores descubrieron que los microRNAs 15 y 16 se encontraban ausentes o regulados negativamente en más del 60% de leucemias linfocíticas crónicas de linfocitos B, puesto que la región cromosómica 13q14, lugar donde estos microRNAs se encuentran, esta deletada en la mayoría de estas neoplasias, indicando así que estos microRNAs se comportaban como supresores tumorales en esta neoplasia (Calin y Croce 2006).

Consecuentemente este grupo de investigación descubrió que un número importante de microRNAs se encontraban en sitios cromosómicos frágiles, amplificados o alterados en el cáncer, lo que sugería que los microRNAs tenían un papel importante en la patogénesis del cáncer. En el año 2005 fue publicado el primer reporte sobre los microRNAs y su función biológica en el cáncer, destacando que estos pueden actuar tanto como supresores tumorales como oncogenes (oncomiRs), y que se encuentran involucrados en una gran variedad de mecanismos no regulados en el cáncer (Sassen *et al.* 2008). Posteriormente, en el año 2010 un estudio llevado a cabo por Medina *et al.* demostró *in vivo* que la sobreexpresión de un solo microRNA, miR-21 era suficiente para desarrollar un proceso neoplásico (Medina *et al.* 2010).

Está bien establecido que los microRNAs son reguladores críticos de la expresión de RNAs mensajeros en procesos biológicos normales y anormales, como el cáncer. La desregulación de los microRNAs se puede observar en distintos tipos de cáncer y se asocia con el comienzo de la neoplasia, la resistencia a terapias y metástasis, por lo que el desarrollo de terapias basadas en la modulación del nivel de expresión de los microRNAs así como la identificación de sus RNAm blancos promete ser una vía para desarrollar terapias antineoplásicas (Takahashi *et al.* 2015). Puesto que las células tumorales poseen diversos y a veces específicos niveles de expresión de microRNAs (miRNoma), se puede hacer uso de estas moléculas como biomarcadores de estos procesos patológicos (Koturbasha *et al.* 2011).

### **2.6.0 MicroRNAs en cáncer de mama**

El perfil de microRNAs en cáncer mamario ha sido estudiado en suero y tejido en diversas poblaciones del mundo, incluyendo mujeres italianas, americanas (Iorio *et al.* 2005), suecas (Abrahamsson y Dabrosin 2015), chinas (Li *et al.* 2013), singapurenses (Chan *et al.* 2013) y mexicanas (Mar-Aguilar *et al.* 2012, 2013). En conjunto con los estudios de identificación de los niveles de microRNAs, el análisis de la actividad de microRNAs que se encuentran regulados positiva o negativamente ayuda a determinar su papel en las diversas enfermedades estudiadas (Kayani *et al.* 2011; Koturbash *et al.* 2011; Takahashi *et al.* 2015).

#### **2.6.1 Iniciadores de la tumoración**

Múltiples estudios han centrado su atención en las células iniciadoras de tumores (CSC) como las responsables del crecimiento y progresión tumoral pues éstas poseen similitudes con las células madre somáticas a excepción de las capacidades de invasión, además de que estas son capaces de exhibir un fenotipo de transición epitelial a mesenquimal (EMT), el cual es frecuentemente observado durante la invasión y la metástasis (Gurses *et al.* 2015; Iorio *et al.* 2005).

MiR Let-7: Es un regulador maestro de las propiedades de autoregeneración e implantación tumoral de las células iniciadoras de tumor, por lo que se encuentra regulado negativamente en algunos procesos neoplásicos, tal es el caso del cáncer de mama.

MiR-205 y familia de miR-200: La familia de miR-200 comprende 5 microRNAs, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429, estos en conjunto con miR-205 inhiben el fenotipo EMT, el cual se caracteriza por la pérdida de la adhesión célula-célula y la adquisición de capacidades celulares invasivas. Este fenotipo se observa frecuentemente en poblaciones celulares de tejido neoplásico de las mamas.

### **2.6.2 Resistencia al Tratamiento**

La resistencia al tratamiento se debe principalmente al efecto de mecanismos que pueden ser clasificados en dos grandes categorías: la alteración de los transportadores de droga que permiten el flujo de agente anticancerígenos y la activación de vías antiapoptóticas o de supervivencia celular (Gurses *et al.* 2015; Iorio *et al.* 2005).

MiR-451, miR-326 y miR-487a: Regulan directamente a los transportadores del cassette de unión a ATP (ABC) ABCB1, ABCC1 y ABCG2, los cuales están asociados al transporte de diversos tipos de agentes quimioterapéuticos no polares hacia el exterior de la célula proporcionando a las células resistencia al tratamiento en cáncer de mama, cáncer de pulmón entre otros.

MiR-221 y miR-222: Regulador negativo de p27kip1, supresor tumoral e inhibidor del ciclo celular. Se han encontrado sobreexpresados en células de cáncer de mama resistentes a diversos agentes quimioterapéuticos.

MiR-30c: Regulador negativo de la interleucina 11 e inhibidor de la resistencia a diversos agentes terapéuticos en cáncer mamario mediante la regulación de la proteína de unión a la actina twinfilina 1, el cual promueve un fenotipo EMT.

### 2.6.3 Metástasis

En adición a la regulación de la quimioresistencia, los microRNAs están involucrados en la modulación de procesos metastásicos, la cual es la causa principal de muerte relacionada al cáncer (Gurses *et al.* 2015; Iorio *et al.* 2005). Algunos ejemplos de miRNAs involucrados en metástasis se describen a continuación:

MiR-10b: Regulador clave en la metástasis en cáncer mamario, pues se encuentra sobreexpresado en líneas celulares de cáncer de mama metastásicas, en comparación con las que no son metastásicas.

MiR-126, miR-206, miR-335: Reguladores de metástasis, proliferación celular y crecimiento tumoral en cáncer de mama.

MiR-31: Regulador negativo de la metástasis en cáncer de mama pues inhibe esta al inhibir la traducción de genes asociados a metástasis, tales como RhoA e ITGA5.

MiR-34a: Inhibidor de la invasión en cáncer de mama a través de la represión del fenotipo EMT

MiR-29b: Inhibe la metástasis mediante la supresión de una cadena de diversos regulares pro-metástasis asociados con la angiogénesis y proteólisis.

MiR-708: Inhibidor de la migración celular y metástasis en cáncer mamario al interactuar la proteína del retículo endoplásmico neuronatina (NNAT), la cual regula los niveles intracelulares de calcio.

### 2.7.0 MicroRNAs como biomarcadores

Debido a que en ocasiones la detección del cáncer en estadios tempranos es difícil y requiere de procedimientos invasivos, es importante entender la capacidad de los microRNAs como biomarcadores, pues en algunas enfermedades muestran patrones de expresión dependiendo del tipo de tumor (Kosaka *et al.* 2010).

La primera vez que se utilizaron microRNAs como biomarcadores, fue en el año 2007 en el estudio de pacientes con linfoma de células B. Desde entonces se estudia el patrón

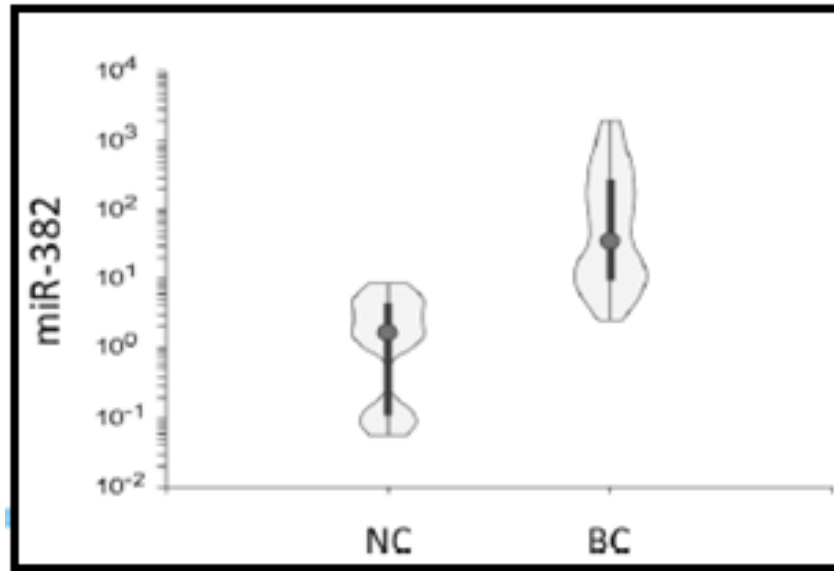
de expresión de microRNAs en las neoplasias y si esto puede funcionar como un biomarcador en la detección de esta enfermedad a través de sus estadios. De esta manera, se han reportado 13 microRNAs enriquecidos en fluidos quísticos de neoplasias invasivas; miR-10b, miR-141 y miR-155 cuya expresión es mayor en el suero de pacientes con cáncer pulmonar en comparación con personas sanas (Roth *et al.* 2011). Por otro lado, miR-1 y miR-133b fueron detectados en orina y correlacionados con padecimientos renales (Wang *et al.* 2016). Así mismo, se han descrito perfiles de microRNAs que permiten estimar la supervivencia del pacientes con cáncer pancreático (Koturbash *et al.* 2010). También se han detectado microRNAs aislados del suero de pacientes con cáncer mamario cuya expresión permitió discriminar entre pacientes con cáncer mamario y aquellos sin patología maligna (Iorio *et al.* 2005; Mar-Aguilar *et al.* 2013). Mar Aguilar *et al.* reportó en nuestro laboratorio la detección de los microRNAs miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155 miR-191 y miR-382 en suero de pacientes con cáncer mamario. De estos microRNAs, destacan miR-145, miR-155 y miR-382 cuyo análisis en combinación demuestra una mayor sensibilidad (97.60%), especificidad (100%) y eficiencia (98%) que las combinaciones de otros miRs detectados. Debido a las características exhibidas por los microRNAs 145, 155 y 382 estos se postularon como posibles biomarcadores en el cáncer de mama (Mar-Aguilar *et al.* 2013). Múltiples estudios detallan las características de miR-145 y miR-155 tanto en personas sanas como en personas con cáncer de mama, no ocurriendo lo mismo con miR-382 el cual ha sido un microRNA poco estudiado en cáncer mamario y por ello características como el mecanismo de transporte y nivel de regulación en mujeres mexicanas se desconocen.

### **2.8.0 MicroRNA-382 y cáncer de mama**

El microRNA-382, se ha estudiado en el carcinoma esofágico de células escamosas donde se encuentra regulado negativamente y con potencial actividad de supresor tumoral, pues su bajos niveles de expresión en esta neoplasia están relacionados con el la pobre supervivencia del paciente y por esta razón fue propuesto como un biomarcador en esta neoplasia (Qi *et al.* 2015).

También se ha encontrado en el adenoma pituitario donde miR-382 es regulado negativamente y se relaciona con metástasis y un pronóstico de supervivencia pobre, por lo que se considera un blanco terapéutico importante (Wu *et al.* 2014). Asimismo, miR-382 es regulado negativamente en el osteosarcoma, donde se le considera un supresor tumoral y un posible agente terapéutico en esta neoplasia (Xu *et al.* 2014). Por otro lado, en el cáncer de ovario, se encontró una delección en la región cromosómica 14q32 que codifica para miR-382 y por lo tanto se postula a miR-382 como supresor tumoral (Thériault *et al.* 2014). En el cáncer gástrico humano, la expresión de miR-382 en un estado de hipoxia, actúa sobre el supresor tumoral PTEN inhibiendo éste, por lo que se considera a miR-382 como un oncogén (Seok *et al.* 2014).

Como ya se describió anteriormente, en nuestro laboratorio se identificó a miR-382 en el suero de pacientes con cáncer de mama originarias del noreste de México, el cual se encontraba sobreexpresado en comparación con los controles sanos, por lo que fue propuesto como biomarcador molecular no invasivo (Mar-Aguilar *et al.* 2013). Además, miR-382 se encontró en muestras de tejido de pacientes con cáncer ductal originarias de China donde se observó que se encontraba expresado negativamente en comparación con los controles sanos (Li *et al.* 2013) por lo que los estudios llevados a cabo por Li *et al.* y Mar-Aguilar *et al.* (Figura 8) contribuyen a postular la importancia de este microRNA en distintas poblaciones.

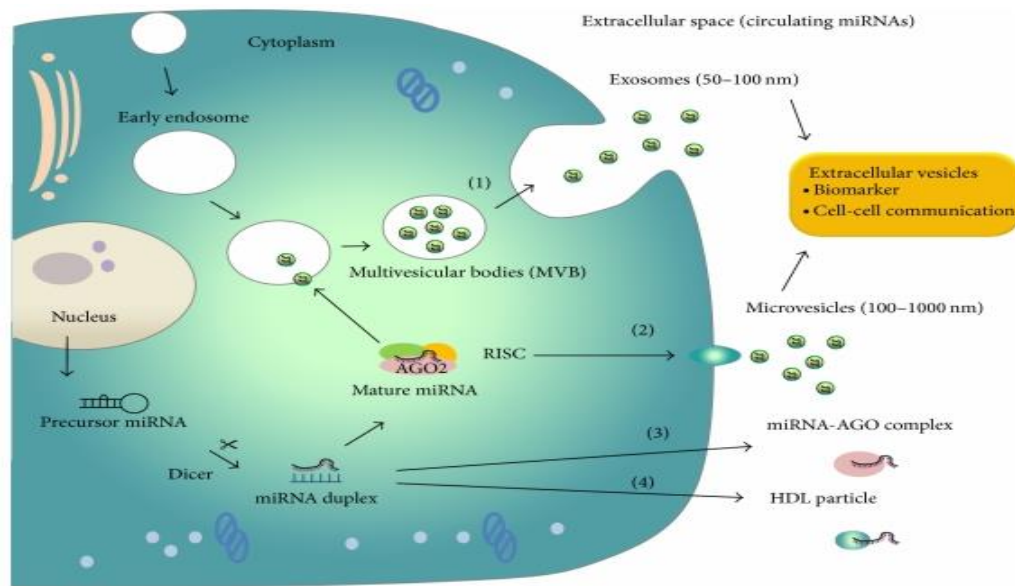


**Figura 8. Sobreexpresión de miR-382 en suero de pacientes con cáncer mamario.** El diagrama muestra el nivel de expresión del miR-382 en suero de pacientes con cáncer de mama (BC) comparado con pacientes sanas (NC). Modificado de Mar-Aguilar *et al.* 2013

## 2.9.0 Transportadores de microRNAs

Los microRNAs se han encontrado en diversos fluidos biológicos como la sangre, orina, saliva y leche materna, ambientes donde se puede encontrar enzimas que degradan al microRNA, por lo que se ha estudiado la manera en la que los microRNAs son estables a dichos ambientes. Entre los mecanismos que le proporcionan estabilidad a los microRNAs se encuentra el acomplejamiento con proteínas argonauta (Ago1-4), con proteínas HDL, el encapsulamiento en exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos (Figura 9). Estos mecanismos se consideran como sistemas de transporte de microRNAs, pues su papel radica en el exporte de miRs a otras partes del cuerpo sin que estos sean degradados por las RNasas que se encuentran de manera natural en el torrente sanguíneo. El proceso radica en la síntesis de un microRNA en el núcleo para exportarse este al citoplasma donde es cortado por la enzima Dicer y genera un microRNA-duplex. A partir de ahí, se pueden seguir dos vías distintas: una vía donde una de las cadenas del microRNA-duplex se asocia a una lipoproteína de alta densidad (HDL) o a una proteína argonauta (1-4) para luego ser exportadas fuera de la célula, mientras que la otra vía incluye el acoplamiento de la cadena líder del microRNA-dúplex a la proteína argonauta 2 para generar el complejo miRISC, el cual puede ser directamente encapsulado en

microvesículas o en cuerpos multivesiculares (MVB). Los cuerpos multivesiculares se forman cuando una parte de la membrana celular se internaliza formando un endosoma. Una vez que dentro del endosoma se forman múltiples vesículas mediante la invaginación de la membrana endosomal, se habrá formado el cuerpo multivesicular el cual libera vesículas exosomales mediante el proceso de exocitosis al fusionarse el cuerpo multivesicular y la membrana plasmática (Zhang *et al.* 2015).

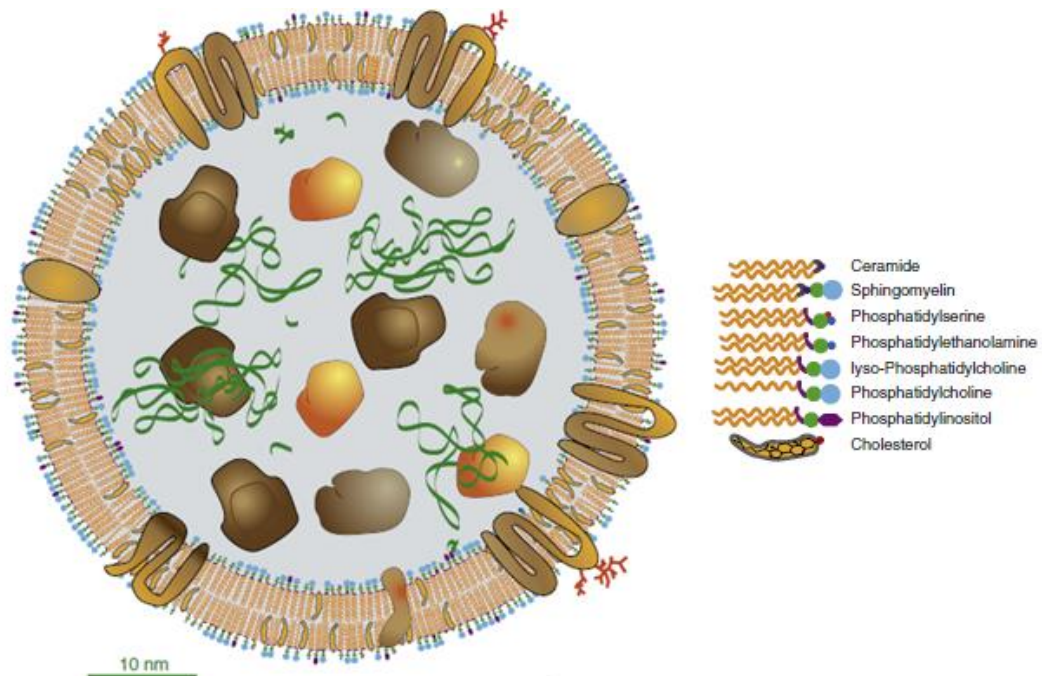


**Figura 9. Transportadores de microRNAs.** Los microRNAs poseen varios transportadores que les permiten migrar en el torrente sanguíneo sin ser degradados. Algunos de estos transportadores son los cuerpos multivesiculares, los exosomas, el complejo microRNA-proteína argonauta, el complejo microRNA-lipoproteína y otras microvesículas de tamaños variados. Tomado de Fujita *et al.* 2014.

### 2.9.1 Exosomas

Los exosomas son el tipo de vesícula celular más estudiado. Fueron descubiertos en el año 1981 y se le nombró así a vesículas aisladas de líneas celulares con capacidad enzimática (Trams *et al.* 1981). De tamaño entre 30-120 nm, poseen una bicapa lipídica y moléculas de membrana como GTPasas, Anexinas, Flotilinas, Rab5b, tetraspaninas, CD9, CD63, CD81, CD82, proteínas de choque térmico Hsp70, Hsp90, proteínas involucradas en la biogénesis de cuerpos multivesiculares Alix, TSG101 así como proteínas ligadas a lípidos y fosfolipasas.





**Figura 10. Representación morfológica de un exosoma.** Los exosomas son vesículas de membrana lipídica con un tamaño de entre 50 y 110 nm. Entre sus proteínas de superficie se encuentran las ceramidas, esfingomielinas, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y colesterol. Los exosomas pueden transportar en su interior proteínas, DNA, RNAs mensajeros y microRNAs. Modificado de Vlassov *et al.* 2012

Los exosomas se generan cuando la membrana celular se internaliza produciendo un endosoma. A partir de la invaginación de esta vesícula se generarán los exosomas, con lo que el endosoma pasará a denominarse cuerpo multivesicular. Finalmente, los exosomas son excretados cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática.

### 2.9.1.1 Función de los Exosomas

Los exosomas pueden ser excretados por varios tipos de células: hematopoyéticas, del epitelio intestinal, adipocitos, neuronas y numerosas líneas celulares tumorales. Al mismo tiempo, los exosomas han sido encontrados en diferentes fluidos corporales como: la sangre, la saliva, la orina, líquido amniótico, líquido sinovial y leche mamaria. Todos estos exosomas secretados por las células al medio juegan un papel dentro de la comunicación celular y participando así en procesos fisiológicos normales o anormales, como es el caso del cáncer. Los exosomas también pueden utilizarse como una forma

para excretar RNAs y proteínas no necesarias para la célula, como es el caso de los reticulocitos al madurar a eritrocitos (Johnstone *et al.* 1987). Actualmente, se conocen tres mecanismos usados por los exosomas para unirse a células. El primero es a través de la interacción de proteínas exosomales transmembrana con los receptores de la células de interés (Munich *et al.* 2012). El segundo es cuando los exosomas se fusionan con la membrana plasmática de la célula, liberando así su contenido en el citosol (Mulcahy *et al.* 2014). El tercero es cuando los exosomas entran a la célula y se forman dos vías. La primera es fusionarse con endosomas para llevar el exosoma a través de la célula y liberarlo a una célula vecina, proceso llamado trancystosis. La segunda opción es que los exosomas que entran a la célula se fusionan generando un endosoma y este madura en lisosomas y se degrade el contenido de estos (Tian *et al.* 2013). De esta manera el material genético dentro de los exosomas puede ingresar a una célula y dentro de esta ser biológicamente activo, adquiriendo enfoque en el sistema de comunicación celular, angiogénesis, hematopoyesis y tumorigénesis (Valadi *et al.* 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el cáncer de mama representa un grave problema para la salud de las mujeres de México (CEAMEG, México 2012), es de gran importancia la identificación de moléculas específicas que funcionen como biomarcadores no invasivos para la detección de esta enfermedad en etapas tempranas así como determinar su valor pronóstico en la progresión y evolución de ésta patología. A pesar de los avances científicos y médicos en la detección y tratamiento del cáncer de mama, esta enfermedad aún se encuentra entre los primeros lugares de mortalidad y morbilidad a nivel mundial. En nuestro laboratorio Mar-Aguilar *et al.* en 2013 detectaron a miR-10b, miR-21, miR-125b, miR-145, miR-155 y miR-382 en el suero de pacientes con cáncer de mama. De estos miRNAs se postularon tres como posibles biomarcadores en el cáncer de mama. Estos eran los microRNAs 145, 155 y 382 que en combinación demuestran una mayor sensibilidad (97.60%), especificidad (100%) y eficiencia (98%) que otros microRNAs de forma individual o en combinación. Existen múltiples estudios que han mostrado a los miR-145 y miR-155 tanto en personas sanas como en personas con cáncer de mama pero no se ha descrito el miR-382 en cáncer mamario y se desconocen las funciones específicas del miR-382 así como el mecanismo de transporte y nivel de regulación en mujeres mexicanas con cáncer mamario.

#### **4. HIPÓTESIS**

El miR-382 se encuentra asociado a exosomas para su exporte en sangre periférica y presenta una asociación con los diferentes estadios en pacientes con cáncer mamario

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

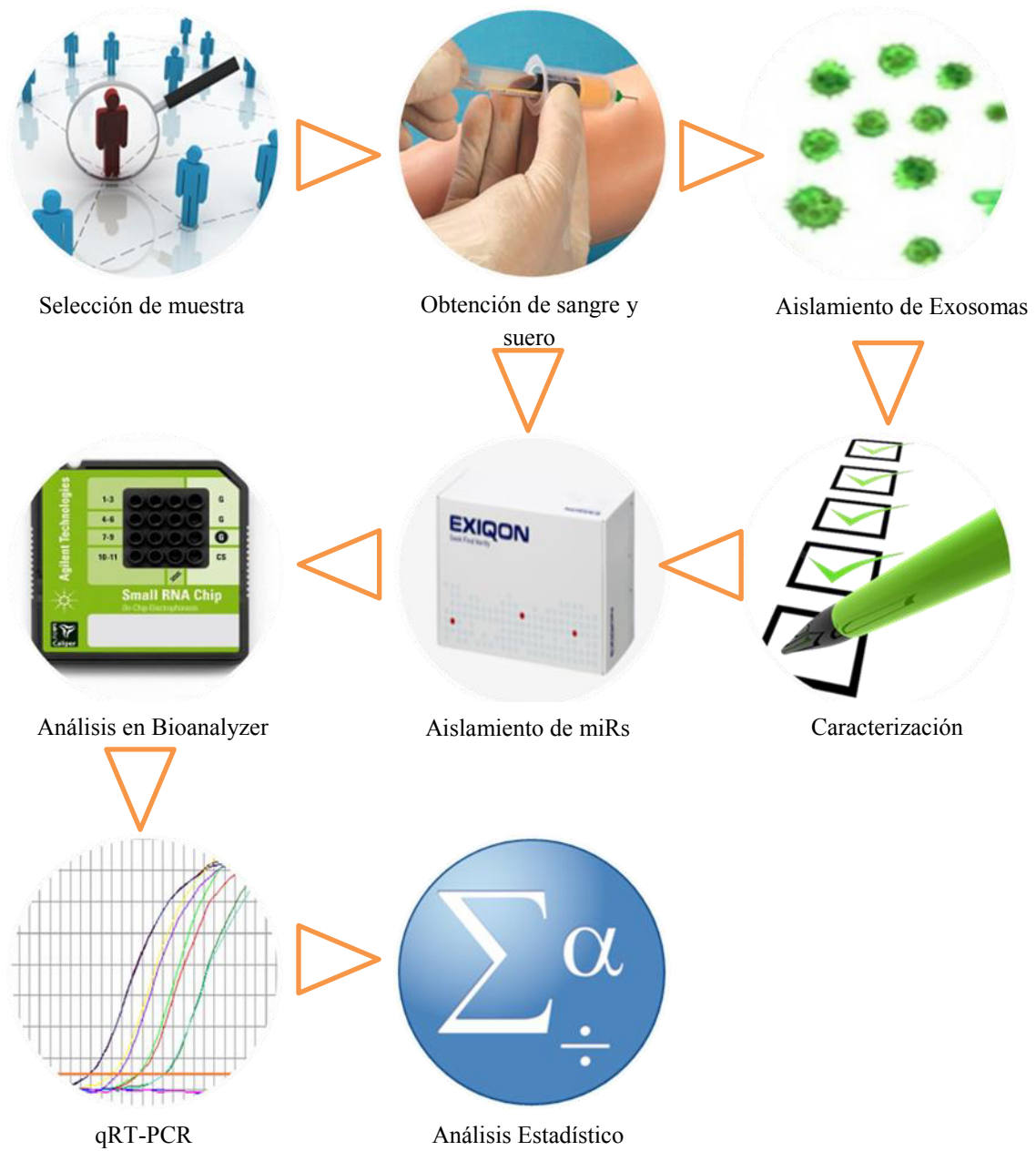
Determinar si miR-382 se encuentra asociado a exosomas y si presenta asociación con estadios y variables clinopatológicas del cáncer mamario en mujeres del Noreste de México.

### **Objetivos Específicos**

1. Corroborar la presencia de miR-382 en suero de mujeres con cáncer mamario provenientes del Noreste de México.
2. Determinar la presencia de miR-382 en exosomas aislados del suero de pacientes con cáncer mamario.
3. Analizar la asociación de miR-382 circulante y exosomal con las características clinicopatológicas en pacientes con cáncer mamario

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Estrategia Experimental



## 6.2. Requerimiento de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama

Las muestras de suero colectadas deberán cumplir con los criterios descritos en la Tabla 2.

**Tabla 2. Criterios para la toma de muestras de suero**

<b>Criterios de inclusión</b>	<b>Criterios de exclusión</b>
Mujeres mayores de 18 años que deseen participar en el estudio	Pacientes con cáncer de mama diferente al ductal
Firma del consentimiento informado	Pacientes que no deseen participar en el estudio
Pacientes con cáncer mamario ductal en estadio I, II, III y IV	Pacientes con otros procesos neoplásicos o cuyo tumor primario no sea ductal
Provenientes de Nuevo León, Coahuila o Tamaulipas	Mujeres en periodo de gestación

El número de muestras que se colectó fue de 5 muestras de suero por cada estadio para un total de 20 muestras además de 5 muestras provenientes de pacientes sanas. La cantidad de suero requerido fue de 6 ml de suero por paciente.

El tiempo para el procesamiento de la muestra iniciando con la toma de muestra hasta la obtención del suero fue de 1-4 horas como máximo. Se colectó la sangre en un tubo de extracción sanguínea para bioquímica (sin anticoagulante) debidamente etiquetado e identificado con los datos del paciente como número de expediente, nombre del paciente y estadio del cáncer de mama ductal. La obtención del suero se llevó a cabo en un tiempo no superior a 1 hora después de la extracción. Posteriormente, se prepararon los viales o crioviales (6 viales o crioviales por paciente) para el almacenaje del suero, debidamente identificados con los datos del paciente como nombre, estadio del cáncer de mama ductal y fecha. Se permitió que la sangre coagulara y en seguida, se centrifugaron los tubos de sangre (sin anticoagulante) a 1500-3000 rpm durante 10 minutos. La fracción superior o sobrenadante de aspecto claro, transparente y de un color amarillento tras la centrifugación correspondió al suero sanguíneo. Se aspiró el suero de manera cuidadosa

evitando en todo momento la hemólisis de las muestras y se hicieron alícuotas de 1 ml del suero sanguíneo obtenido de cada paciente en los viales debidamente etiquetados e identificados. Finalmente se almacenaron los viales en cajas de crio almacenaje a una temperatura de -80°C, hasta su uso.

### **6.3. Curva de eficiencia de miR-16 como primer normalizador**

Para realizar la curva de la sonda de miR-16, se cultivaron células Hek-293 en medio DMEM con FBS 10% en condiciones de 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Después de que la confluencia fue de 90-95%, se añadieron 2 mL de tripsina para posteriormente ser incubadas por 5 min a 37° C para estimular la separación de las células de la pared del flask. Una vez separadas las células de la pared del flask, se tomaron alícuotas de 2 mL y fueron colocadas en un tubo eppendorf, donde fueron centrifugadas por 1 min a 1000 g. Este paso se repitió hasta colectar todas las células del flask. Una vez que las células fueron colectadas en el tubo de 2 mL, se agregaron 700 µL de Qiazol lysis reagent y se dio vortex hasta que el pellet se disgregó, para luego dejar reposar por 5 min a temperatura ambiente. Seguido de esto, se añadieron 140 µL de cloroformo se mezcló por inversión durante 15 seg para luego ser incubado por 2-3 min. Después de la incubación, se centrifugó durante 15 min a 12,000 g a temperatura 4° C y la fase superior (acuosa) se pasó a un tubo de colecta, midiendo cuantos mL fueron. Esta cantidad se multiplicó por 1.5 y se añadió ese volumen de etanol al 100% y se mezcló por inversión. A continuación, se transfirieron 700 µL a la columna RNeasy mini spin, colocada en un tubo nuevo de 2 mL. Se centrifugó a 10,000 rpm y se descartó el líquido para conservar la columna y repetir el paso con el resto de la muestra. Posteriormente, a la columna se le añadieron 700 µL de buffer RWT seguido de una centrifugación por 15 seg a 10,000 g. Se descartó el líquido filtrado y se procedió a añadir 500 µL de buffer RPE a la columna para centrifugar 15 seg a 10,000 y descartar el líquido nuevamente. Este paso se repitió una segunda vez, seguido de una centrifugación por 2 min a 10,000 g y se descartó el resto del buffer que quedaba en la columna. La columna fue movida a otro tubo y se añadieron 25 µL de agua libre de RNasas directo a la columna, para luego reposar a temperatura ambiente por 2 min y centrifugar a 10,000 g. Este paso se repitió



una vez más hasta obtener un volumen de 50  $\mu\text{L}$ . Este tubo de RNA concentrado se etiquetó adecuadamente, para luego tomar 2  $\mu\text{L}$  y medir la concentración de RNA usando el Nanodrop. Después de conocer la concentración, se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la solución de RNA concentrado y en un tubo nuevo se diluyó hasta una concentración de 5 ng. Posteriormente, se preparó el master mix para la transcripción reversa según lo indicado en la Tabla 3.

**Tabla 3. Master mix para transcripción reversa**

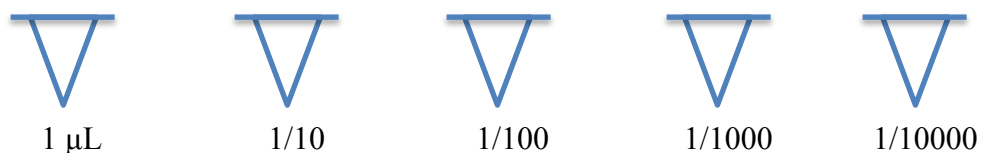
Master Mix 1X	
0.15 $\mu\text{L}$	dNTPs
1 $\mu\text{L}$	Transcriptasa Reversa
1.50 $\mu\text{L}$	Buffer
0.19 $\mu\text{L}$	Inhibidor de Rnasa
4.16 $\mu\text{L}$	Agua
3 $\mu\text{L}$	Primer
5 $\mu\text{L}$	Muestra de RNA

Una vez preparado el master mix, se procedió a hacer la transcripción reversa según las temperaturas y tiempos descritos en la Tabla 4.

**Tabla 4. Temperaturas para transcripción reversa**

Temperatura	Tiempo
16° C	30 min
42° C	30 min
85 °C	5 min

Una vez obtenido el cDNA, por triplicado se llevó acabo el siguiente esquema de dilución del cDNA:



De estos triplicados, se realizó una qPCR según lo indicado en la Tabla 5.

**Tabla 5. Master Mix para qPCR**

Master Mix 1X	
5 µL	PCR mix
3.5 µL	Agua
0.5 µL	Taqman Primer
1 µL	cDNA

Acto seguido se realizó la qPCR programando la reacción de manera que al inicio tuviese un ciclo de 600 seg a 95°, seguido de 2 step amplification conformado por 40 ciclos de 95° C por 15 seg y 60° C por 60 seg. Al finalizar la reacción se realizó la gráfica de la curva de los datos obtenidos usando el programa excel.

#### **6.4. Detección y cuantificación del miR-382 aislado de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas**

Para aislar el RNA del suero de pacientes con cáncer de mama y personas sanas, se siguieron las instrucciones del kit miRCURY™ RNA Isolation Kit -Biofluids (Exiqon), el cual indicó que posterior a la descongelación de las muestras, éstas debían ser centrifugadas a 3000 g por 5 min. Después de la centrifugación se transfirieron 200 µL del supernadante a un tubo nuevo y se añadieron 60 µL de Lysis solution buffer para luego aplicar vortex por 5 seg e incubar por 3 min a temperatura ambiente. Se procedió a añadir 20 µL de Protein precipitation solución buffer seguido de vortex por 5 seg, una incubación por 1 min a temperatura ambiente y una centrifugación por 3 min a 11,000 g. Después de centrifugar, se transfirió el supernadante a un tubo nuevo de 2 mL y se añadieron 270 µL de isopropanol absoluto seguido de vortex por 5 seg. Acto seguido, se transfirió la columna microRNA Mini Spin a un tubo de colecta y se cargó la muestra procesada para incubar por 2 min a temperatura ambiente y luego centrifugar por 30 segundos a 11,000 g. Se descartó el líquido y se conservó la columna, donde se añadieron 100 µL de Wash solution 1, para luego centrifugar por 30 seg a 11,000 g y descartar el líquido. Posteriormente se añadieron 700 µL de Wash solution 2 a la columna para centrifugar por 2 min a 11,000 g y descartar el líquido. La centrifugación se repitió una vez más por 2 min a 11,000 g para secar la columna y descartar el líquido

restante. A continuación, se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL y se añadieron 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa directo a la columna, donde se incubó por 1 min a temperatura ambiente para luego centrifugar 1 min a 11,000 g. Finalmente, se almacenó el RNA aislado a -80° C.

Posteriormente, se preparó el master mix para la transcripción reversa según lo indicado en la Tabla 6.

**Tabla 6. Master Mix para transcripción reversa**

Master Mix 1X	
0.15 $\mu$ L	dNTPs
1 $\mu$ L	Transcriptasa Reversa
1.50 $\mu$ L	Buffer
0.19 $\mu$ L	Inhibidor de RNasa
4.16 $\mu$ L	Agua
3 $\mu$ L	Primer
5 $\mu$ L	Muestra de RNA

Una vez preparado el master mix, se procedió a hacer la transcripción reversa según las temperaturas y tiempos indicados en la Tabla 7.

**Tabla 7. Temperaturas para transcripción reversa**

Temperatura	Tiempo
16° C	30 min
42° C	30 min
85 °C	5 min

Después de obtener el cDNA, los niveles de expresión miR-382 fueron cuantificados por triplicado mediante qPCR, utilizando sondas Taqman y el Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). La reacción de qPCR se preparó según lo indicado en la Tabla 8.

**Tabla 8. Master Mix para qPCR**

Master Mix 1X	
5 $\mu$ L	PCR mix
3.5 $\mu$ L	Agua
0.5 $\mu$ L	Taqman Primer
1 $\mu$ L	cDNA

Acto seguido se realizó la qPCR programando la reacción de manera que al inicio tuviese un ciclo de 600 seg a 95°, seguido de 2 step amplification conformado por 40 ciclos de 95° C por 15 seg y 60° C por 60 seg. Al finalizar la reacción se realizó el análisis de la expresión relativa del microRNA usando el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) en excel.

### **6.5. Aislamiento de exosomas a partir de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas**

Para aislar los exosomas del suero de pacientes con cáncer de mama y personas sanas, se empleó el kit ExoQuick™ (SystemBio), cuyas instrucciones indicaron la toma de 250 µl de muestra de suero, para centrifugarlos a 1500 g por 15 min y transferir el supernadante a un tubo nuevo, donde se añadieron 63 µL de Exoquick y se mezclaron por inversión. Acto seguido se incubó la muestra durante 12 horas. Seguido de esto, se centrifugó a 1500 g por 30 min a 4° C, se retiró y desechó el supernadante con el cuidado de no perturbar el precipitado. Después de retirar el supernadante, el pellet se resuspendió en 200 µL de buffer PBS para finalmente ser almacenado a -80° C. Estos se conservaron en estas condiciones hasta su uso en microscopía de fuerza atómica, western blot y el aislamiento de sus microRNAs.

### **6.6. Caracterización de exosomas**

La caracterización de los exosomas aislados del suero se llevó a cabo mediante el análisis del tamaño por microscopía de fuerza atómica (AFM). Para esto, una vez aislados los exosomas se resuspendieron los exosomas en 300 µL de buffer PBS 1X mediante vortex a baja agitación. Una vez los exosomas estaban bien disgregados, se procedió a adsorber la muestra en la superficie de micas, para luego lavarlas con agua desionizada y dejarlas secar. Acto seguido, se colocó el cantiléver RTESPA-300 en el microscopio de fuerza atómica NTEGRA, para luego colocar cuidadosamente las

laminillas de mica en el lector del microscopio y hacer escaneos de la muestra en áreas de 8x8 micrómetros en modo semi-contacto (tapping).

El análisis de los marcadores proteicos de membrana exosomales se realizó mediante western blot, donde la electroforesis (PAGE) se realizó en buffer de corrimiento a 40 V para el gel concentrador y a 70 V para el gel separador. Después se realizó la inmunotransferencia del gel a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó con leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 en agitación constante. Posteriormente, los anticuerpos primarios de CD63, CD9, CD81, Alix y Hsp70 fueron agregados por separado a las membranas correspondientes y se incubó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-Tween 1X pH 7.4 y acto seguido se agregó el anticuerpo secundario anti-Fc de ratón o conejo (dependiendo del anticuerpo primario utilizado) a la membrana, se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por 2 h y se utilizó como control de carga  $\beta$  actina. Para detectar las proteínas a través de quimioluminiscencia, se agregó a la membrana el sustrato y se realizó la exposición durante diferentes tiempos en la máquina de revelado radiográfico AFP IMAGING.

## **6.7. Extracción de RNAs pequeños de exosomas**

Para aislar los microRNAs de los exosomas, se utilizó el kit miRCURY™ RNA Isolation Kit for Serum and Plasma - Exosome Isolation siguiendo las instrucciones del fabricante. A la muestra de exosomas se le agregaron 60  $\mu$ L de Lysis solution buffer, se dio vortex por 5 seg y se incubó por 3 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 20  $\mu$ L de Protein precipitation solution buffer, seguido de vortex por 5 seg y una incubación por 1 min a temperatura ambiente. Enseguida, se centrifugó por 3 min a 11,000 g y se transfirió el supernadante a un tubo nuevo de 2 mL donde se añadieron 270  $\mu$ L de isopropanol absoluto para después dar vortex por 5 seg. Después se colocó la columna microRNA Mini Spin en un tubo de colecta donde se cargó la muestra y se incubó por 2 min a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación por 30 segundos a 11,000 g. A continuación se descartó el líquido filtrado y se conservó la

columna donde se añadieron 100  $\mu$ L de Wash solution 1 para luego centrifugar por 30 seg a 11,000 g y descartar el líquido. Luego se añadieron 700  $\mu$ L de Wash solution 2 a la columna, para luego centrifugar por 2 min a 11,000 g y descartar el líquido, donde nuevamente se centrifugó 2 min a 11,000 g para secar la columna y descartar cualquier líquido remanente. Finalmente, se colocó la columna en un tubo de 1.5 mL y se añadieron 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa directo a la columna, para incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar 1 min a 11,000 g. Una vez aislados los microRNAs, se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C.

### **6.8. Análisis de pureza de RNAs pequeños exosomales en Bioanalyzer**

La pureza de los microRNAs aislados fue analizada mediante el empleo del Agilent RNA 6000 picochip kit y el Bioanalyzer Agilent. Para preparar los RNA picos chips, los reactivos se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min después de sacarse de refrigeración, teniendo el cuidado de proteger el gel-dye de la luz. Después de los 30 min, se colocaron 9  $\mu$ L de la mezcla gel-dye en el espacio marcado con la letra G. Posteriormente, se colocó el chip en la estación de preparación para ejercer en el poso G una presión de 1 ml por 30 segundos. Pasados los 30 segundos, se levantó la estación y el chip se dejó reposar por 5 seg. Acto seguido, se colocaron 9  $\mu$ L de la mezcla gel-dye en los espacios restantes del chip. Enseguida, se colocaron 9  $\mu$ L de solución de acondicionamiento en el espacio marcado con CS para después colocar 5  $\mu$ L de RNA 6000 pico marker en el espacio marcado con el símbolo de una escalera y en cada uno de los 11 espacio para muestras. Después, se colocó 1  $\mu$ L de RNA 6000 pico ladder en el espacio con el símbolo de una escalera para luego colocar 1  $\mu$ L de muestra en los espacios respectivos del chip. Posteriormente se agitó el chip mediante vortex por 60 seg a 2400 rpm. Para finalizar, después de la agitación y antes de que pasaran 5 min, se colocó el chip en el Bioanalyzer Agilent para ejecutar el análisis de pureza de microRNAs.

## 6.9. Detección y cuantificación del miR-382 exosomal aislado de muestras de suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas

Una vez conocida la pureza de los microRNAs aislados, se llevó a cabo la transcripción reversa siguiendo las instrucciones de Quanta Biosciences qScript microRNA cDNA synthesis kit, las cuales indicaron como primer paso la formación de la cola de polyadeninas preparada según la tabla 9.

**Tabla 9. Mix de PolyAdenilación**

Reacción de PolyAdenilación	
2 $\mu$ L	PolyA Tailing Buffer 5X
1 a 7 $\mu$ L	Agua
1 $\mu$ L	Poly(A) polymerase
1 a 7 $\mu$ L	RNA

Acto seguido se mezcló el mix de polyadenilación mediante vortex y se incubó a 37°C durante 60 min seguido de 5 min a 70°C. Después de esto, se centrifugó el mix de polyadenilación para luego mantenerse en hielo hasta la síntesis de cDNA. Para llevar a cabo la síntesis de cDNA, se preparó un mix según lo indicado en la tabla 10.

**Tabla 10. Mix de cDNA**

Reacción de PolyAdenilación	
10 $\mu$ L	PolyA Tailing Mix
9 $\mu$ L	microcDNA reaction mix
1 $\mu$ L	qScript reverse transcriptase

Posteriormente se mezcló el mix de síntesis de cDNA y se incubó por 20 min a 42°C y luego a 85°C por 5 min, para finalmente ser almacenado a -80°C hasta su uso. Una vez obtenido el cDNA, se preparó el mix de qPCR según lo indicado en la tabla 11.

**Tabla 11. Mix de qPCR**

Mix para reacción de qPCR	
25 $\mu$ L	Perfecta SYBR Green super mix 2X
1 $\mu$ L	Perfecta microRNA assay primer
1 a 24 $\mu$ L	microRNA cDNA
1 a 24 $\mu$ L	Agua

Finalmente, se mezcló el mix de qPCR mediante vortex y se colocó en el termociclador durante 40 ciclos junto a las temperaturas y tiempos mostrados en la tabla 12.

**Tabla 12. Temperaturas para transcripción reversa**

Temperatura	Tiempo
95° C	2 min
95° C	4 seg
60 °C	30 seg

La expresión relativa de microRNA fue calculada usando el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

### 6.10. Análisis Estadístico

El análisis de normalidad de nuestros datos se realizó mediante la evaluación del Quantile-Quantile plot proporcionado por el paquete estadístico SPSS. Al observar que los datos no muestran una distribución normal, se procedió a hacer pruebas de Kruskal-Wallis para comparar los valores de expresión del microRNA-382 presente en suero y exosoma con las variables de edad  $60 \leq$  y  $60 >$ , estadio 0-4, estadio temprano/tardío, presencia/ausencia de nodos linfáticos invadidos y expresión alta/baja de miR-382. En los casos donde Kruskal-Wallis proporcionaba un resultado significativo, se usó la prueba de Mann Whitney U para analizar cual comparación era significativamente diferente. Para que el valor de  $p$  fuese significativo en las pruebas de Mann Whitney U derivadas de una prueba de Kruskal-Wallis estadísticamente significativa,  $p$  debía ser inferior al valor de  $\alpha$  modificado ( $0.05/\#$  de combinaciones). La prueba de Mann Whitney U se usó además para comparar la expresión de miR-382 ante la presencia/ausencia de cáncer. La comparación de los parámetros clinopatológicos y la expresión alta/baja de microRNA-382 en suero y exosoma fue analizada mediante el uso de la prueba de chi cuadrada.



## 7. RESULTADOS

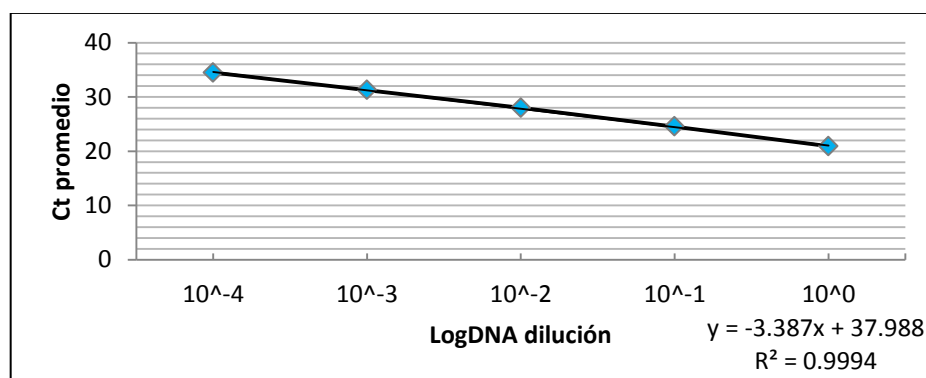
### 7.1 Detección y cuantificación de miR-382 en suero de mujeres con cáncer mamario

#### 7.1.1 Curva de eficiencia del normalizador endógeno microRNA-16

Para validar la eficiencia de la expresión del normalizador endógeno miR-16, se llevó a cabo la extracción de RNA de células HEK-293 para posteriormente realizar un qPCR y así evaluar la eficiencia de amplificación de la sonda del miR-16 cuya expresión gráfica se puede observar en la Fig. 11. El porcentaje de eficiencia fue calculado mediante la ecuación  $((10^{(-1/-3.387)})-1)*100$  obteniendo un resultado de 97.35% de amplificación como se muestra en la Tabla 13. El valor obtenido se encuentra en el rango de 90-105%, por lo que la el microRNA-16 es adecuado para ser utilizado como normalizador endógeno.

**Tabla 13. Cálculo de eficiencia de amplificación de miR-16 mediante el método de Livak**

Dilución	LogDNA dilución	Ct			Ct Promedio	Eficiencia
1/10000	10 <sup>-4</sup>	34.812	34.271	34.346	34.4763333	97.3542716
1/1000	10 <sup>-3</sup>	31.08	31.31	31.347	31.2456667	
1/100	10 <sup>-2</sup>	28.109	27.918	27.923	27.9833333	
1/10	10 <sup>-1</sup>	24.629	24.456	24.493	24.526	
0	10 <sup>0</sup>	21.017	20.842	21	20.901	



**Figura 11. Curva de amplificación de miR-16.** La pendiente mostrada en la gráfica indica que las condiciones usadas para el experimento son adecuadas para analizarlos niveles de expresión de miR-16. La eficiencia calculada de miR-16 fue de 97.35% de amplificación.

### **7.1.2 Detección del microRNA-382 en el suero de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas**

Para determinar los niveles de miR-382 en suero, mediante qPCR se realizó por triplicado su análisis obteniendo así los ciclos de amplificación (CT). La Tabla 14 muestra los CTs de miR-382 y miR-16. Los CTs de miR-382 van desde 24.444 hasta 40.713 y mientras que los CTs de miR-16 van desde 23.274 hasta 30.593. De esta manera se determinó la presencia de miR-382 en suero, puesto que los CT demuestran la amplificación de miR-382 en el suero analizado. Estos CTs fueron posteriormente promediados y los utilizados para el cálculo del  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados de la Tabla 15 muestran los promedios de CT de miR-382 y miR-16 de cada uno de los 20 pacientes con cáncer de mama y los 5 pacientes sanos. Nuestros resultados indican que el miR-382 es secretado a torrente sanguíneo en pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas.

**Tabla 14. Ciclos de amplificación de microRNA-382 en suero**

<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>			<b>miR-16</b>		
1S	38.868	38.247	38.616	25.074	25.079	24.932
3S	39.165	39.224	38.561	25.435	25.481	25.450
5S	39.293	38.396	40.713	24.511	24.459	24.428
6S	38.533	39.015	40.206	24.749	24.732	24.755
7S	37.773	37.381	37.797	25.133	25.191	25.225
3	39.302	39.359	39.379	24.703	24.729	24.754
13	40.042	40.211	39.230	25.785	25.742	25.785
20	37.329	37.061	37.548	24.693	24.695	24.754
31	38.754	40.817	38.595	30.593	30.250	30.193
41	36.051	36.042	36.518	26.409	26.300	26.399
7	37.754	37.646	38.925	25.702	25.671	25.811
9	39.220	39.233	39.418	27.573	27.484	27.273
40	36.925	35.991	36.382	23.914	24.221	24.106
27	37.949	37.920	39.203	24.578	24.668	24.610
46	34.482	34.277	34.444	23.274	23.421	23.309
2	38.964	37.808	38.639	30.075	30.213	30.056
5	37.896	38.896	37.250	25.493	25.614	25.529
17	39.292	39.532	39.716	24.538	24.543	24.627
56	37.244	38.543	38.364	25.538	25.679	25.601
35	35.105	35.517	35.108	24.465	24.547	24.478
26	38.674	39.403	39.384	25.564	25.555	25.461
4	37.195	36.486	36.835	23.679	23.669	23.645
11	38.835	38.814	39.400	25.979	25.888	25.894
21	37.773	39.464	38.133	24.146	24.081	24.092
22	37.318	36.940	37.650	23.618	23.653	23.644

**Tabla 15. Promedios de ciclos de amplificación de miR-382**

<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>	<b>miR-16</b>	<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>	<b>miR-16</b>
3	39.35	24.73	1S	38.58	25.03
13	39.83	25.77	4S	38.98	25.46
20	37.31	24.71	5S	39.47	24.47
31	39.39	30.35	6S	39.25	24.75
41	36.2	26.37	7S	37.65	25.18
7	38.11	25.73			
9	39.29	27.44			
40	36.43	24.08			
27	38.36	24.62			
46	34.4	23.33			
2	38.47	30.11			
5	38.01	25.55			
17	39.51	24.57			
56	38.05	25.61			
35	35.24	24.5			
26	39.15	25.53			
4	36.84	23.66			
11	39.02	25.92			
21	38.46	24.11			
22	37.3	23.64			

### 7.1.3 Cuantificación relativa de microRNA-382 en el suero

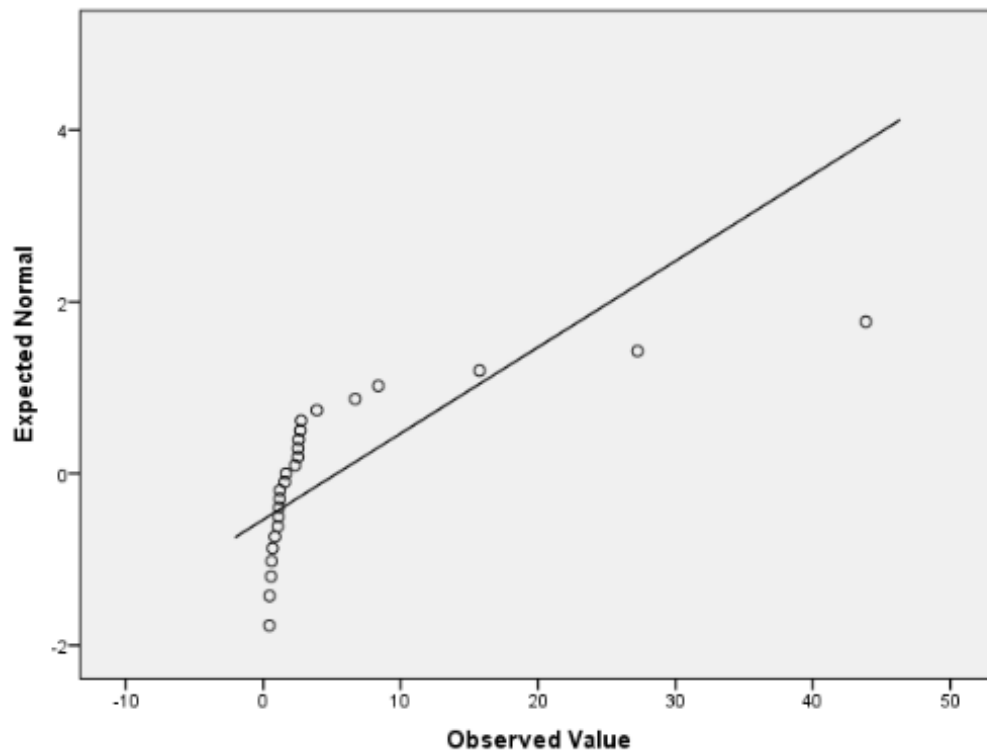
Para realizar la cuantificación relativa de miR-382 en suero se utilizó el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) y los promedios de CTs mostrados en la Tabla 15 utilizando como normalizador endógeno el nivel de expresión de miR-16. Los resultados muestran en la Tabla 16 los  $\Delta\Delta CT$  de miR-382 a nivel de suero de pacientes con cáncer mamario y personas sanas mostrados. Estos cálculos fueron utilizados en los análisis de asociación de miR-382 en suero con las características clinicopatológicas.

**Tabla 16. Niveles de expresión de miR-382 calculadas mediante el método de Livak**

<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>	<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>
3	0.5712787	1S	1.1988075
13	0.8428026	4S	1.2161041
20	2.3159434	5S	0.4379789
31	27.226381	6S	0.6173954
41	15.735306	7S	2.5366656
7	2.6943427		
9	3.8994392		
40	2.7471455		
27	1.0508815		
46	6.6989423		
2	43.85289		
5	2.5343223		
17	0.4557349		
56	2.5774302		
35	8.3605624		
26	1.135452		
4	1.5539427		
11	1.6406491		
21	0.6877391		
22	1.1064462		

#### 7.1.4 Distribución no normal de la expresión de microRNA-382 en suero

Para analizar si la distribución de los datos de detección de miR-382 en suero es normal, se realizó un Quantile-Quantile plot de los datos obtenidos en tabla 16. Los resultados muestran que el nivel de miR-382 no sigue la línea de tendencia mostrada en el Q-Q plot (Fig. 12), lo que nos permite concluir que los datos analizados no poseen una distribución normal, por lo que la estadística que se aplica es no paramétrica.



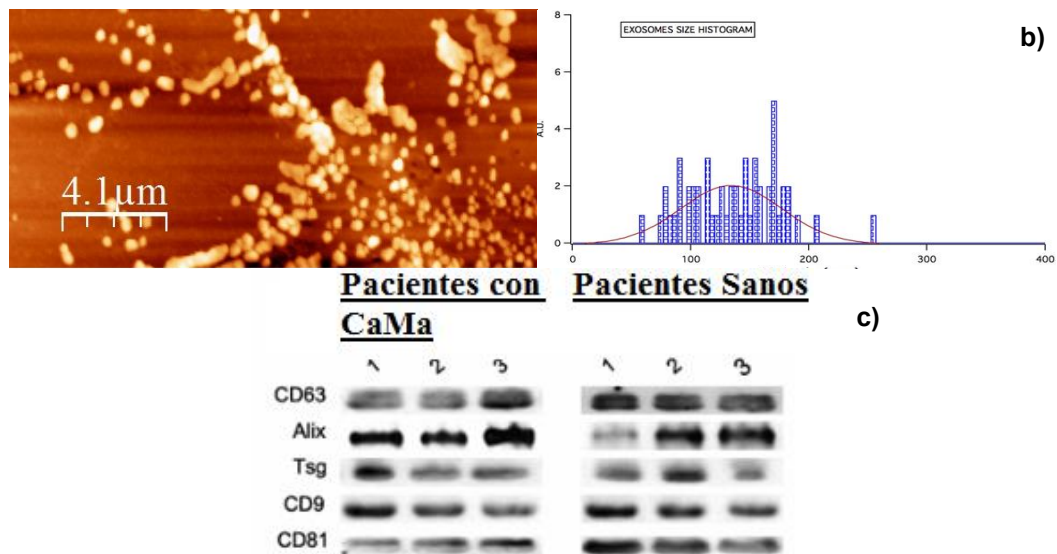
**Figura 12. Distribución de datos de miR-382 aislado de suero.** La pendiente mostrada en la gráfica indica el posicionamiento adecuado de los datos para seguir una distribución normal. Debido a que los datos no se posicionan sobre esta pendiente la distribución es no normal o paramétrica

#### 7.2 Detección del miR-382 en exosomas aislados del suero de pacientes con cáncer mamario

### 7.2.1 Aislamiento y caracterización de exosomas

Una vez aislados los exosomas mediante el uso del kit Exoquick, el cual hace uso de politetilenglicol (PEG) para formar una red que atrapa y precipita los exosomas, se realizó la caracterización de las vesículas aisladas del suero de pacientes con cáncer de mama y de muestras control. El análisis de las vesículas mediante microscopía de fuerza atómica permitió la toma de una fotografía de altura en modo semi-contacto (Fig. 13a) lo que permitió analizar el tamaño de las vesículas desde un ángulo de 90° que muestran una tendencia de aglomeración. La medición de la distribución de tamaño muestra el rango de tamaño que va desde los 80nm hasta los 180nm, con una media aproximada de 120 nm (Fig. 13b). Con estos resultados concluimos que las vesículas aisladas del suero de pacientes con cáncer de mama y de las muestras control son exosomas.

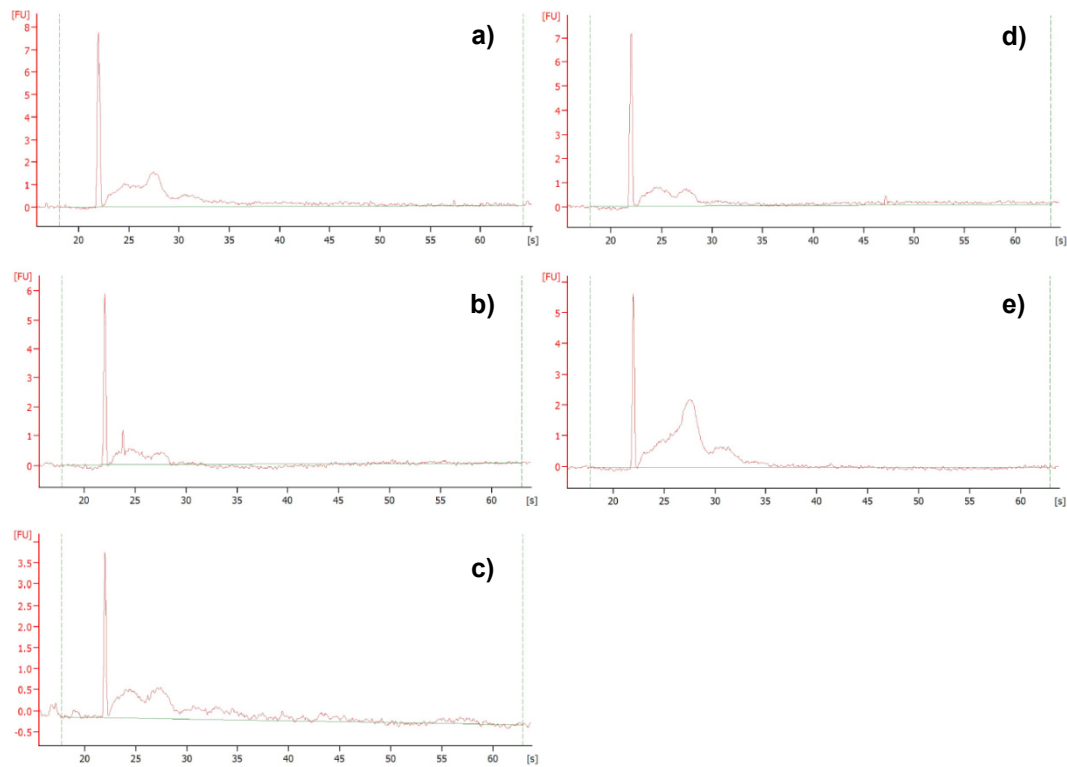
Además, se identificaron marcadores de membrana exosomal mediante western blot. La Fig. 13c muestra los marcadores proteicos: CD63, Hsp70, CD81, Alix y CD9 que se encuentran en la superficie de la membrana exosomal tanto en pacientes con cáncer de mama como en pacientes sanos.



**Figura 13. Caracterización de exosomas aislados de muestras de suero en pacientes con cáncer de mama.** a) Imagen de altura, tomada mediante microscopía de fuerza atómica donde se observa una tendencia de aglomeración de los exosomas, b) Distribución que muestra el rango de tamaño de los exosomas de 80-180 nm con un promedio de 120 nm y c) Detección de las proteínas CD63, Alix, Tsg, CD9 y CD81 mediante western blot, las cuales son marcadores de superficie para la identificación de exosomas.

### 7.2.2 Pureza de RNAs pequeños aislados de exosomas

Para analizar la pureza de los microRNAs aislados de los exosomas se sometieron estos a un análisis empleando el uso de chips los cuales se analizan mediante el principio de electroforesis en el Bioanalyzer Agilent. La señal emitida mediante fluorescencia en el Bioanalyzer indica que los picos emitidos entre los segundos 20 y 30 detectan la presencia de microRNAs. La ausencia de contaminación por otro tipo de RNAs se observa al no emitirse otros picos de fluorescencia entre los segundos 40 y 50 donde usualmente se detecta la presencia de RNA 18S y RNA 28S (Fig. 14). Debido a esto concluimos que la presencia de RNAs pequeños aislados de exosomas en pacientes con cáncer de mama.



**Figura 14. Aislamiento de microRNAs exosomales.** Los microRNAs contenidos en el exosomas se analizaron mediante Bioanalyzer de las muestras 5s (a), 13 (b), 7 (c), 17 (d) y 22 (e) donde se observa la detección entre los 20-30 segundos, la cual corresponde al tiempo de detección de RNAs pequeños.



### **7.2.3 Amplificación del microRNA-382 exosomal obtenido de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas**

Para determinar el transporte de miR-382 en los exosomas, se realizó por triplicado la amplificación del contenido exosomal mediante qPCR obteniendo así los ciclos de amplificación que van de 28.92 hasta 37.02 para miR-382 y de 19.63 hasta 26.09 para miR-16. Estos CTs se muestran en la Tabla 17. De esta manera se determinó la presencia de miR-382 exosomal, puesto que los CT demuestran la amplificación de miR-382 en los exosomas. Estos CTs fueron posteriormente promediados, como se muestra en la Tabla 18. Los promedios de los CTs de miR-382 y miR-16 corresponden a cada uno de los 20 pacientes con cáncer de mama y los 5 pacientes sanos. Estos promedios se utilizaron posteriormente para el cálculo del  $\Delta\Delta CT$ . Los resultados obtenidos muestran la presencia del miR-382 dentro de los exosomas en muestras provenientes de pacientes con cáncer y pacientes sanos.

**Tabla 17. Ciclos de amplificación (CTs) del microRNA-382 exosomal**

<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>			<b>miR-16</b>		
1S	35.93	37.02	36.29	26.08	25.80	26.09
4S	33.18	32.66	33.03	21.20	21.36	21.19
5S	32.20	32.67	32.56	21.39	21.57	21.67
6S	33.07	33.74	33.01	22.76	23.15	22.86
7S	30.69	30.69	30.52	21.88	21.97	21.88
3	32.94	33.99	33.10	23.22	23.18	23.24
13	32.66	32.68	32.66	23.20	23.37	23.31
20	31.96	32.45	32.53	21.48	21.74	21.67
31	33.87	33.25	33.55	23.94	24.13	24.12
41	30.51	30.35	30.49	21.18	21.12	21.17
7	33.99	34.49	33.38	23.90	23.79	24.00
9	32.97	35.01	34.76	23.66	23.41	23.35
40	30.33	30.49	30.48	21.07	21.13	21.24
27	32.78	32.99	33.06	21.57	21.71	21.77
46	29.30	28.92	29.28	19.63	19.76	19.87
2	31.59	31.60	31.58	20.52	20.67	20.67
5	31.25	31.05	30.96	22.54	22.81	22.72
17	33.10	33.22	33.10	22.78	22.68	23.01
56	30.75	31.38	30.62	21.07	20.97	21.17
35	31.44	31.94	32.10	22.22	22.10	22.15
26	32.98	32.67	33.08	22.92	22.87	23.04
4	34.21	35.26	34.49	25.04	24.90	24.80
11	33.71	34.06	33.11	23.34	23.40	23.31
21	34.13	33.67	33.61	22.36	22.12	22.32
22	32.37	32.45	32.45	21.56	21.72	21.52

**Tabla 18. Promedio de CT del miR-382 exosomal**

<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>	<b>miR-16</b>	<b>Muestra</b>	<b>miR-382</b>	<b>miR-16</b>
3	33.34	23.22	1S	36.41	25.99
13	32.67	23.29	4S	32.96	21.25
20	32.31	21.63	5S	32.48	21.55
31	33.56	24.06	6S	33.27	22.93
41	30.45	21.16	7S	30.63	21.91
7	33.95	23.9			
9	34.24	23.47			
40	30.43	21.15			
27	32.95	21.69			
46	29.17	19.75			
2	31.59	20.62			
5	31.09	22.69			
17	33.14	22.82			
56	30.92	21.07			
35	31.83	22.16			
26	32.91	22.94			
4	34.65	24.91			
11	33.63	23.35			
21	33.81	22.27			
22	32.42	21.6			

#### 7.2.4 Cuantificación relativa del microRNA 382 exosomal en muestras de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas

Para realizar la cuantificación relativa de miR-382 aislado de los exosomas, se utilizó el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) y los promedios de CTs mostrados en la Tabla 18 utilizando como normalizador el nivel de expresión de miR-16. Los resultados de la Tabla 19 muestran los  $\Delta\Delta CT$  de miR-382 exosomal en pacientes con cáncer mamario y personas sanas. Posteriormente se utilizaron estos cálculos en los análisis de miR-382 exosomal y su asociación con variables clinopatológicas.

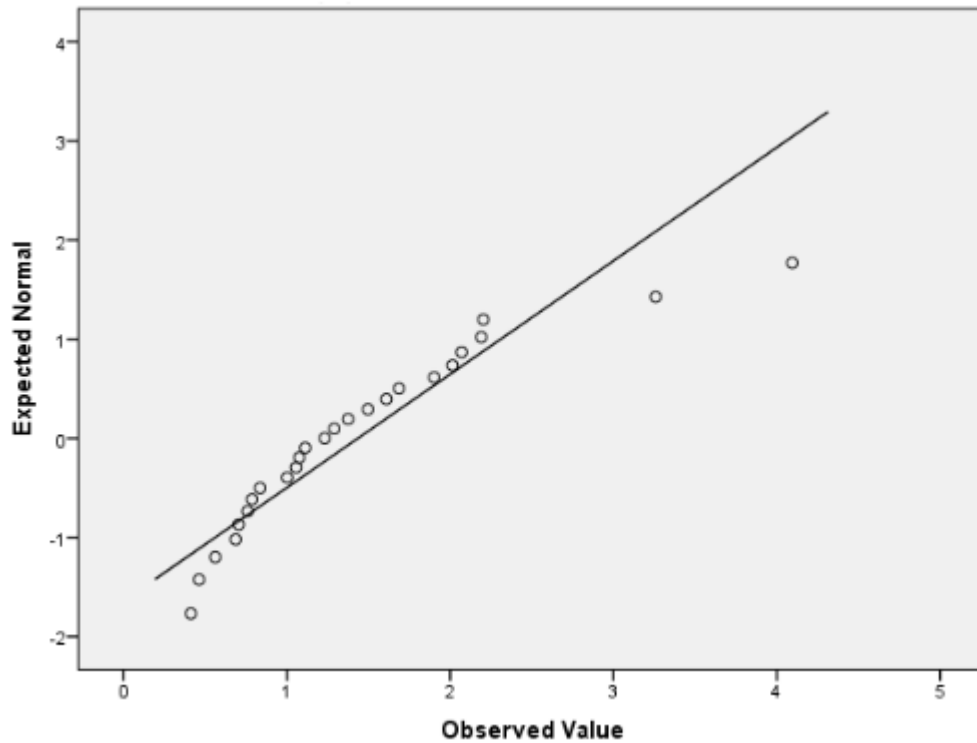
**Tabla 19. Niveles de expresión de miR-382 calculadas mediante el método de Livak**

Muestra	miR-382	Muestra	miR-382
3	1.23116518	1S	1.00209334
13	2.07048677	4S	0.4115946
20	0.83674224	5S	0.70437813
31	1.90250909	6S	1.05649081
41	2.18971358	7S	3.25799616
7	1.29080856		
9	0.78712245		
40	2.20322081		
27	0.56071226		
46	2.01480589		
2	0.68719221		
5	4.09521689		
17	1.07584491		
56	1.49677909		
35	1.68619684		
26	1.37420131		
4	1.60948727		
11	1.11154488		
21	0.46182052		
22	0.75855093		

#### 7.2.5 Distribución no normal del microRNA-382 exosomal

Para analizar la distribución de los datos de detección de miR-382 exosomal, se realizó un Quantile-Quantile plot de los datos obtenidos para miR-382 mostrados en la Tabla

15. La figura 15 muestra que los datos no siguen en su totalidad la línea de tendencia mostrada en el Q-Q plot, lo que nos permite concluir que los datos analizados no poseen una distribución normal, por lo que la estadística que se aplica es no paramétrica.



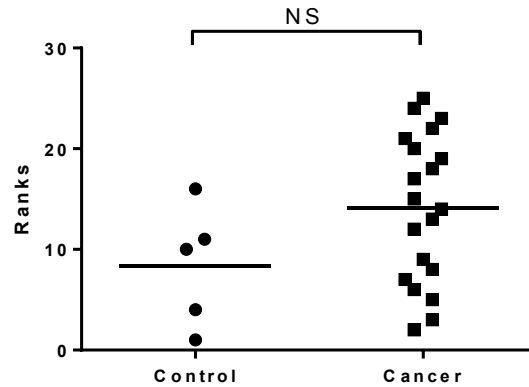
**Figura 15. Distribución de datos de miR-382 aislado de exosomas.** La pendiente mostrada indica el posicionamiento que los datos deberían seguir para ser una distribución normal. Debido a que los datos no se posicionan sobre esta pendiente la distribución es no normal.

### **7.3 Asociación del miR-382 circulante y exosomal con las características clinopatológicas de pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas provenientes del Noreste de México**

#### **7.3.1 Asociación del miR-382 en suero con el cáncer de mama ductal**

Para observar si la detección de miR-382 aislado de suero podría usarse en la diferenciación de pacientes sanos con aquellos que presentaban la neoplasia, se realizó la comparación de miR-382 en muestras control y pacientes con cáncer (Fig. 16). Los resultados obtenidos no presentan diferencias significativas ( $MWU = 27$ ,  $p = 0.1206$ ),

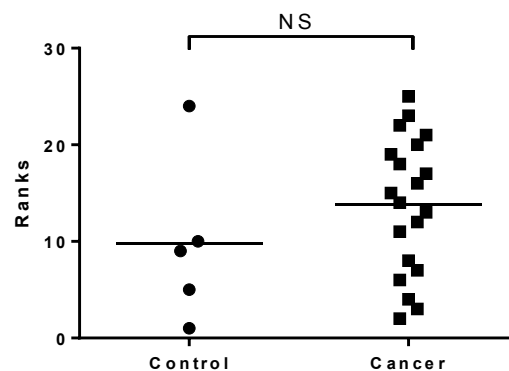
por lo que con los rangos de detección de miR-382 no podemos especificar si la muestra analizada proviene de una persona sana o una persona con cáncer de mama.



**Figura 16. Detección del miR-382 en suero de pacientes con cáncer mamario y personas sanas.** La figura muestra la comparación de la detección de miR-382 de pacientes con cáncer y pacientes sanos ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.2 Asociación del miR-382 exosomal con el cáncer de mama ductal

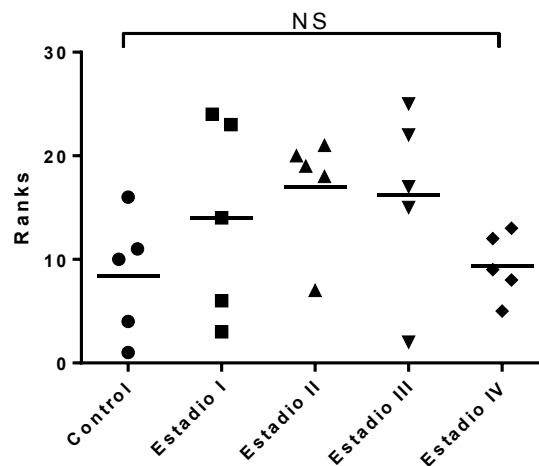
Para determinar si la presencia de miR-382 exosomal es diferente en pacientes sanos comparados con aquellos que presentan la neoplasia, se realizó la comparación de los pacientes con cáncer vs las muestras control. Nuestros resultados mostrados en la Fig. 17 indican que no hay diferencias significativas ( $MWU = 34$ ,  $p = 0.2829$ ) entre miR-382 exosomal de los pacientes con cáncer de mama comparado persona sanas.



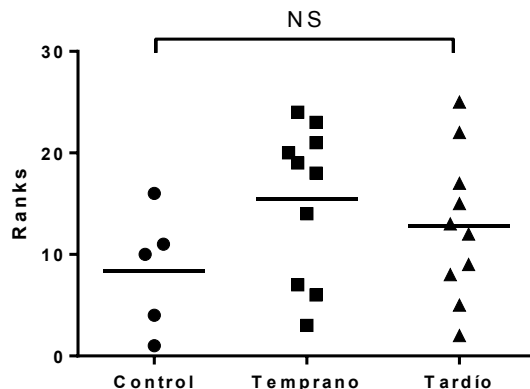
**Figura 17. Detección de miR-382 exosomal en pacientes con cáncer mamario y personas sanas.** Se muestra la comparación del nivel de miR-382 exosomal en el suero de pacientes con cáncer y pacientes sanos ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.3 Asociación de miR-382 en suero con los estadios del cáncer de mama ductal

Para determinar la asociación de miR-382 aislado de suero con los estadios del cáncer mamario se comparó el nivel de miR-382 en cada uno de los estadios. Los resultados en la Figura 18 no mostraron diferencias significativas entre los datos analizados ( $KW = 5.664$ ,  $p = 0.2257$ ) por lo que se formaron grupos de estadios tempranos (I y II) y estadios tardíos (III y IV) para comparar los rangos de detección de miR-382 con los controles sanos. No se encontró una diferencia significativa al comparar los controles con los estadios tempranos/tardíos ( $KW = 3.114$ ,  $p = 0.2107$ ) (Figura 19): Estos resultados sugieren que los rangos de detección de miR-382 aislado del suero de pacientes con cáncer de mama no permiten distinguir el estadio en el que se encuentra una paciente, ya sea tomando los estadios como I, II, III y IV o categorizando estos en estadios temprano y tardíos.



**Figura 18. Detección de miR-382 en el suero de los diferentes estadios de cáncer de mama.** La gráfica muestra la detección del microRNA-382 en suero de pacientes sanos comparado con cada estadio del cáncer mamario ( $p > 0.05$ ).

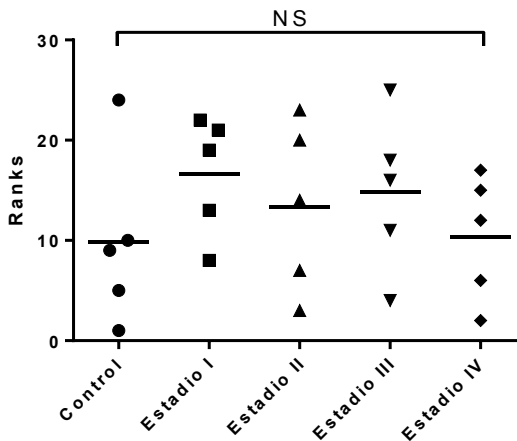


**Figura 19. Detección de miR-382 en suero en estadios tempranos y tardíos de cáncer de mama.** La gráfica muestra el rango de detección del microRNA-382 en el suero de pacientes sanas comparado con el miR-382 en los estadios tempranos (I, II) y tardíos (III, IV) ( $p > 0.05$ ).

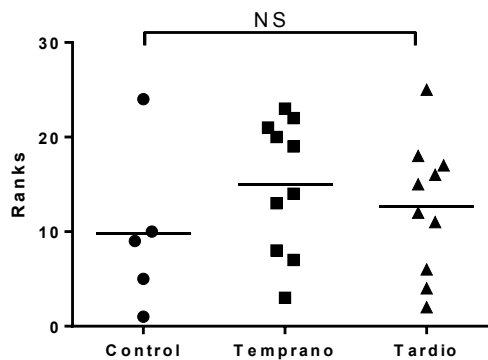
#### 7.3.4 Asociación de miR-382 en suero con los estadios del cáncer de mama ductal

Para determinar la asociación de miR-382 exosomal con los estadios del cáncer, se compararon los rangos de detección de miR-382 aislado del exosomas en cada uno de los estadios. Los resultados en la Fig. 20 no muestran diferencias significativa entre los datos analizados ( $KW = 3.079$ ,  $p = 0.5446$ ). Debido a que de manera individual el miR-382 exosomal no mostró diferencias en los distintos estadios, estos se agruparon en categorías de estadios tempranos (I y II) y estadios tardíos (III y IV) para comparar el nivel de miR-382 exosomal con los controles. La Fig. 21 muestra que no se encontró una diferencia significativa al analizar los rangos de miR-382 en estadios tempranos (I y II) vs estadios tardíos (III y IV) vs los controles ( $KW = 1.713$ ,  $p = 0.4246$ ). Estos resultados indican que el miR-382 aislado de exosomas de pacientes con cáncer de mama no permite distinguir el estadio en el que se encuentra una paciente.





**Figura 20. Detección de miR-382 exosomal en los diferentes estadios de cáncer de mama.** La gráfica muestra el rango de detección del microRNA-382 aislado de exosomas de pacientes sanos comparado en cada estadio del cáncer mamario ( $p > 0.05$ ).

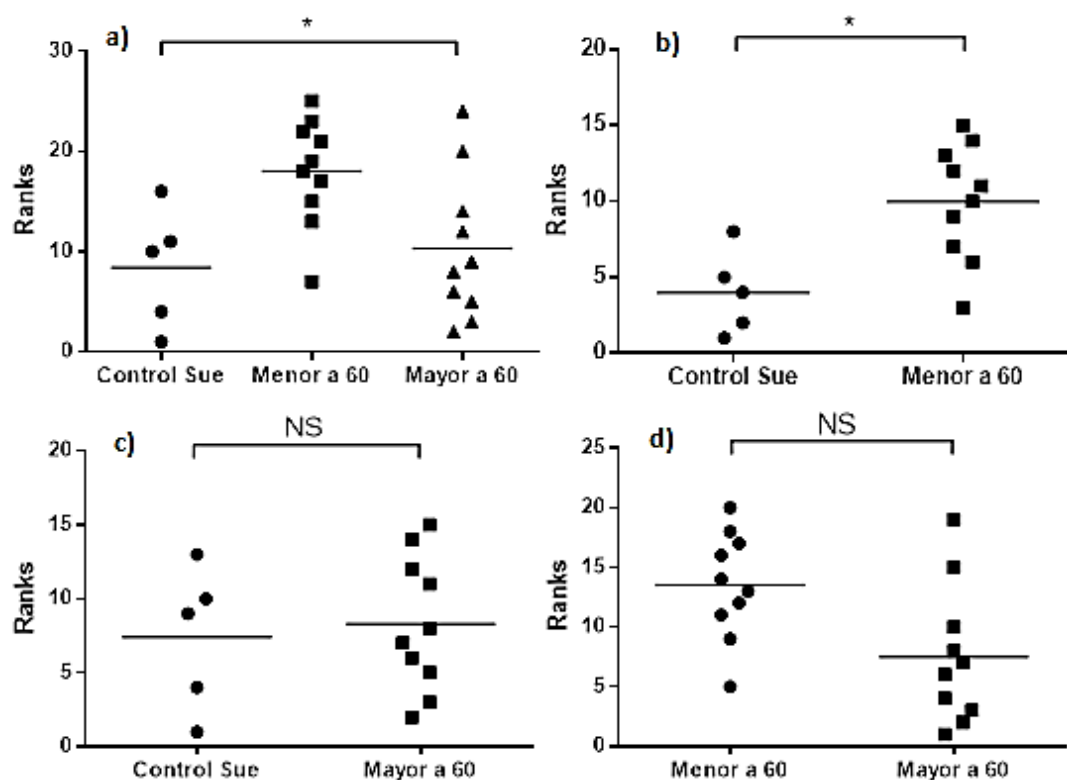


**Figura 21. Detección de miR-382 exosomal en estadios tempranos y tardíos de cáncer de mama.** La gráfica muestra el rango del microRNA-382 exosomal de pacientes sanas comparado con el miR-382 en los estadios tempranos (I, II) y tardíos (III, IV) ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.5 Asociación de miR-382 en suero con la edad

Para observar si la detección de miR-382 aislado de suero se asociaba a la edad, se comparó el microRNA-382 en suero de pacientes sanos con el grupo de pacientes menores a 60 años y el grupo de pacientes mayores a 60 años. Los resultados en la Fig. 22a mostraron una diferencia significativa en esta comparación ( $KW = 7.914$ ,  $p = 0.0191$ ). Para detallar qué comparación proporcionaba esta diferencia significativa, se procedió a realizar la prueba de Mann Whitney U de las comparaciones entre control vs menor a 60 años, control vs mayor a 60 años y menor a 60 años vs mayor a 60 años.

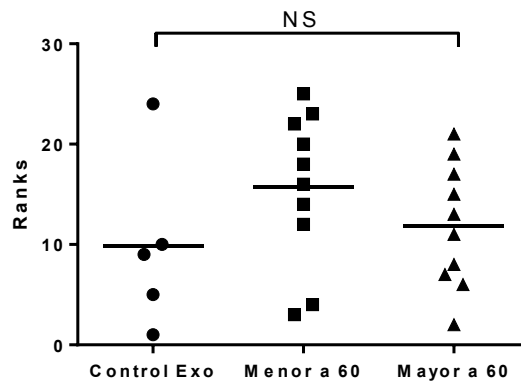
Puesto que son tres comparaciones posibles para la prueba, se aplicó la fórmula de alfa modificada ( $\alpha/\#$  de comparaciones) proporcionando un nuevo valor de 0.016. Los resultados obtenidos mostraron que el análisis de control vs menor a 60 (Fig. 22b) mostró una diferencia significativa (MWU = 5,  $p = 0.0127$ ), el análisis de control vs mayor a 60 (Fig. 22c) no demostró diferencias significativas (MWU = 22,  $p = 0.7173$ ) y el análisis de menor a 60 vs mayor a 60 (Fig. 22d) no demostró diferencias significativas (MWU = 20,  $p = 0.0232$ ). Con estos resultados encontramos que los rangos de miR-382 aislado de suero se asocian de manera significativa a los pacientes con una edad menor a 60 años.



**Figura 22. Transporte de miR-382 en suero según la edad de las pacientes de cáncer de mama.** La figura a) muestra el rango de detección de microRNA-382 en el suero de pacientes sanos comparado con pacientes con 60 años o menos y pacientes mayores a 60 años ( $p < 0.05$ ). La figura b) muestra el rango de miR-382 en suero de pacientes sanos comparados con pacientes menores a 60 años ( $p < 0.05$ ). La figura c) muestra el rango de miR-382 en suero de pacientes sanos comparados con pacientes mayores a 60 años ( $p > 0.05$ ) y la figura d) muestra el rango de miR-382 en suero de pacientes menores de 60 años comparados con pacientes mayores a 60 años ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.6 Asociación de miR-382 exosomal con la edad

Para analizar la asociación del transporte de miR-382 en exosomas con la edad, se comparó el microRNA-382 exosomal del grupo de pacientes menores a 60 años y el grupo de pacientes mayores a 60 años con las muestras control. Los resultados en la Fig. 23 no muestra una diferencia significativa al comparar los niveles de miR-382 en pacientes sanos y pacientes menores y mayores a 60 años (KW = 2.514,  $p = 0.2844$ ). Estos resultados indican que miR-382 aislado de exosomas no se asocia a la edad, ya sea categorizada en personas menores y mayores de 60 años.

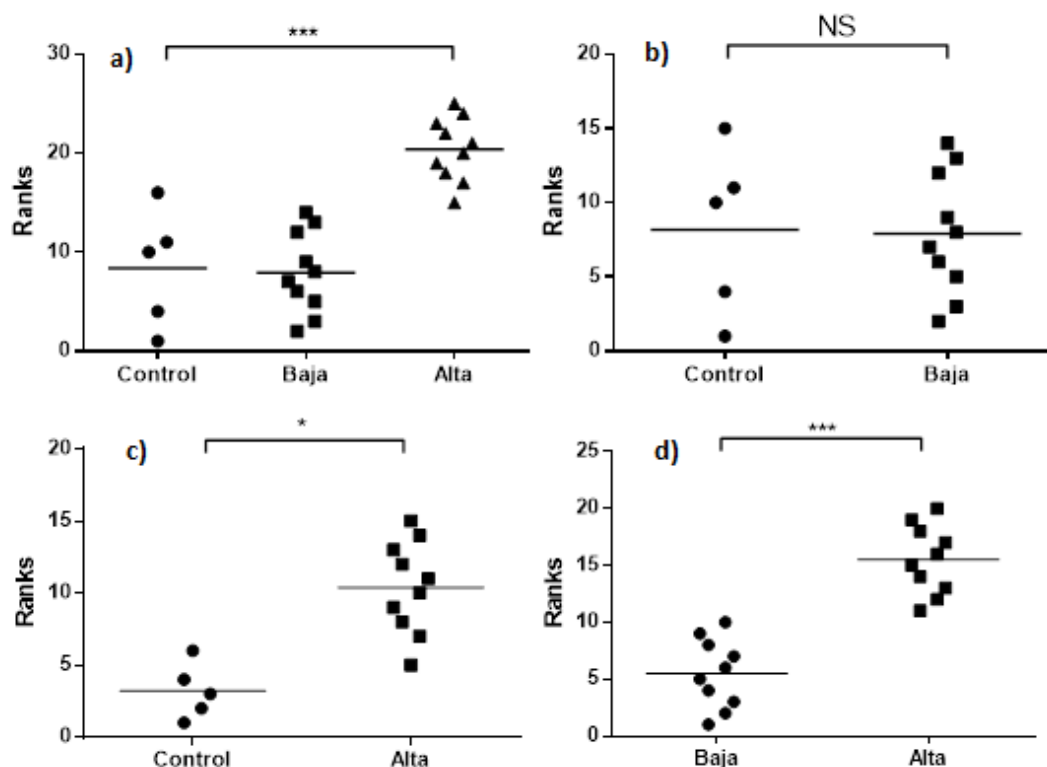


**Figura 23. Transporte de miR-382 exosomal según la edad de las pacientes de cáncer de mama.** La gráfica muestra la detección del microRNA-382 exosomal en pacientes sanas comparado con grupos de pacientes con 60 años o menos y pacientes mayores a 60 años ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.7 Asociación del cáncer con un nivel bajo/alto de miR-382 en suero

Para analizar si el miR-382 aislado de suero se asociaba con un nivel de detección alto/bajo, se analizó la asociación de este microRNA en los pacientes de cáncer categorizada en detección baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) y detección alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ) comparado con los controles. Encontramos así una diferencia significativa al realizar la prueba de Kruskal-Wallis en la comparación detección baja vs alta vs control (KW = 16.86,  $p = 0.0002$ ) (Fig. 24a). Para observar qué comparación proporcionaba una diferencia significativa, se procedió a realizar la prueba de Mann Whitney U de las comparaciones de detección baja y alta vs control. Puesto que son tres comparaciones

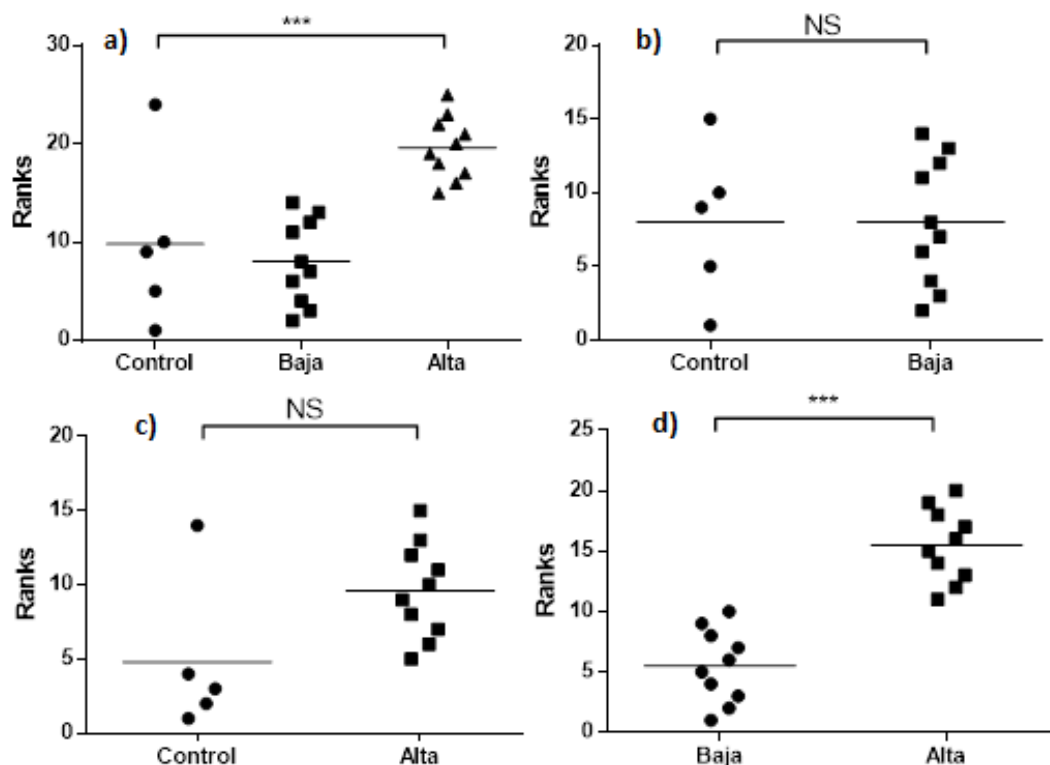
posibles para la prueba, se aplicó la fórmula de alfa modificada ( $\alpha/\#$  de comparaciones) proporcionando un nuevo valor de 0.016. Al realizar el análisis de detección baja vs control (Fig. 24b) no se encontró una diferencia significativa (MWU = 24,  $p = 0.9451$ ), mientras que el análisis de detección alta vs control (Fig. 24c) demostró diferencias significativas (MWU = 1,  $p = 0.0013$ ) al igual que la detección baja vs alta (Fig. 24d) donde se encontró una diferencia significativa (MWU = 0,  $p = 0.0001$ ). Los resultados obtenidos muestran que miR-382 aislado de suero permite diferenciar aquellos pacientes que expresan miR-382 de una manera alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ) del grupo control y de aquellos que expresaban miR-382 de una manera baja.



**Figura 24. Detección alta y baja de miR-382 en suero de pacientes con cáncer de mama.** a) La figura muestra los rangos de detección de microRNA-382 en suero de pacientes sanos comparado con grupos de detección baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) y alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ) ( $p < 0.05$ ). b) Muestra los rangos de detección de miR-382 en suero de pacientes sanos comparados con pacientes de detección baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) ( $p > 0.05$ ). c) Muestra los rangos de detección de miR-382 en suero de pacientes sanos comparados con pacientes de alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ) ( $p < 0.05$ ). d) Muestra los rangos de detección de miR-382 en suero de pacientes de detección baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) comparados con pacientes de detección alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ) ( $p < 0.05$ ).

### **7.3.8 Asociación del cáncer con un nivel bajo/alto de miR-382 en exosomas**

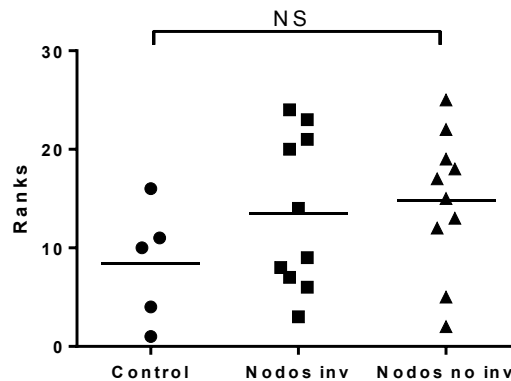
Para analizar si el miR-382 exosomal se asociaba con un nivel de detección alto/bajo, se analizó la asociación de este microRNA en los pacientes de cáncer categorizando los niveles de detección en baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 1.3325$ ) y alta ( $\Delta\Delta Ct > 1.3325$ ) vs los controles. Los resultados mostraron una diferencia significativa al realizar la prueba de Kruskal-Wallis (KW = 16.86,  $p = 0.0002$ ) (Fig. 25a). Para observar qué comparación proporcionaba una diferencia significativa, se procedió a realizar la prueba de Mann Whitney U de las comparaciones entre detección baja, alta y control. Puesto que son tres comparaciones posibles para la prueba, se aplicó la fórmula de alfa modificada ( $\alpha/\#$  de comparaciones) proporcionando un nuevo valor de 0.016. Al realizar el análisis de control vs detección baja (Fig. 25b) no se encontró una diferencia significativa (MWU = 25,  $p = 0.9999$ ) al igual que en el análisis de control vs detección alta (Fig. 25c) donde no se encontraron diferencias significativas (MWU = 9,  $p = 0.0539$ ). Al realizar el análisis de detección baja vs alta (Fig. 25d) se encontró una diferencia estadísticamente significativa (MWU = 0,  $p = 0.0001$ ). Estos resultados indican que el aislamiento de miR-382 exosomal nos permite diferenciar a los pacientes que tienen un rango de detección alto de miR-382 exosomal de aquellos que tienen un nivel bajo de este microRNA.



**Figura 25. Detección alta y baja de miR-382 exosomal en pacientes de cáncer de mama.** La figura a) muestra los rangos de detección de microRNA-382 exosomal de pacientes sanos comparado con grupos de expresión baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 1.3325$ ) y expresión alta ( $\Delta\Delta Ct > 1.3325$ ) ( $p < 0.05$ ). La figura b) muestra los rangos de expresión de miR-382 exosomal de pacientes sanos comparados con pacientes de expresión baja ( $p > 0.05$ ). La figura c) muestra los rangos de expresión de miR-382 exosomal de pacientes sanos comparados con pacientes de expresión alta ( $p > 0.05$ ). La figura d) muestra los rangos de expresión de miR-382 exosomal de pacientes de expresión baja comparados con pacientes de expresión alta ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.9 Asociación de miR-382 en suero con la invasión de nodos linfáticos

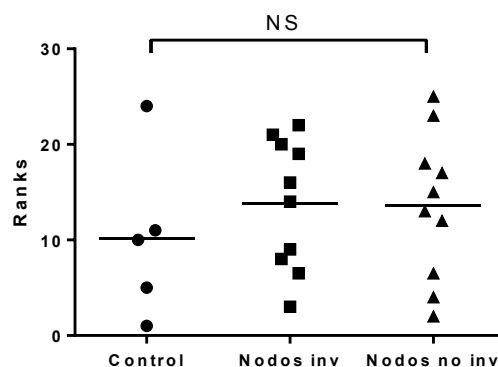
Para asociar el nivel de detección de miR-382 con la invasión de nodos linfáticos en los pacientes con cáncer mamario, comparamos los niveles de este microRNA en los pacientes que tenían cáncer y nodos linfáticos invadidos con aquellos pacientes que tenían cáncer pero eran libres de la invasión de nodos linfáticos y el grupo control. No se encontró ninguna diferencia significativa que asociara al microRNA-382 con la invasión de nodos linfáticos ( $KW = 2.598$ ,  $p = 0.2729$ ) (Fig. 26). Esto indica que los rangos de detección de miR-382 en suero no se asocian a la presencia o ausencia de invasión de nodos linfáticos en pacientes con cáncer de mama.



**Figura 26. Detección de miR-382 en pacientes y su relación con nodos linfáticos.** La gráfica muestra los rangos de detección de microRNA-382 en suero de pacientes sanos comparados con los pacientes que presentaron nodos linfáticos invadidos o no presentaron esta invasión ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.10 Asociación de miR-382 exosomal con la invasión de nodos linfáticos

Para asociar el nivel de detección de miR-382 exosomal a la invasión de nodos linfáticos en los pacientes con cáncer mamario, comparamos los niveles de este microRNA en los pacientes que tenían cáncer y nodos linfáticos invadidos con aquellos pacientes que tenían cáncer pero eran libres de nodos linfáticos invadidos. La Fig. 27 muestra que no se encontró ninguna diferencia significativa que asociara al microRNA-382 exosomal con la invasión de nodos linfáticos ( $KW = 0.9133$ ,  $p = 0.6334$ ) (Fig. 27), por lo que los rangos de detección de miR-382 exosomal no se asocian a la presencia o ausencia de invasión de nodos linfáticos en pacientes con cáncer de mama.



**Figura 27. Detección de miR-382 exosomal en pacientes y su relación con nodos linfáticos.** La gráfica muestra los rangos de detección de microRNA-382 exosomal de pacientes sanos comparados con los pacientes que presentaron nodos linfáticos invadidos o no presentaron esta invasión ( $p > 0.05$ ).

### 7.3.11 Asociación de las variables clinicopatológicas con el nivel alto/bajo de miR-382 detectado en suero

Para determinar la asociación entre variables clinicopatológicas y la detección de miR-382 aislado de suero, se utilizó la categorización de detección baja y alta según la Fig. 24 en conjunto con el número de sueros de pacientes con cáncer de mama estudiados (20). Este análisis demostró una asociación significativa ( $p = 0.012$ ) entre la categorización de edad  $< 60/ \geq 60$  y el número de casos categorizados como detección baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) y alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ). La tabla 20 muestra que no se encontró asociación significativa entre el estadio categorizado en temprano/tardío y el nivel de miR-382 ( $p = 0.328$ ) o al asociar nodos linfáticos invadidos/no invadidos con la detección de miR-382 ( $p = 0.382$ ). Los resultados obtenidos indican que existe una asociación significativa entre la edad categorizada en  $< 60/ \geq 60$  y el nivel de detección bajo ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) y alto ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ), mientras que esta asociación no ocurre con las demás variables clinicopatológicas.

**Tabla 20. Asociación de miR-382 en suero con las variables clinicopatológicas**

Suero		Detección de miR-382		
Variables	No. de casos	Bajo (n%)	Alta (n%)	Valor de P
Edad				$P < 0.05$
<60	10	1 (10.0)	9 (90.0)	
$\geq 60$	10	7 (70.0)	3 (30.0)	
Estadio				$P > 0.05$
I-II	10	3 (30.0)	7 (70.0)	
III-IV	10	5 (50.0)	5 (50.0)	
Nodos linfáticos Invadidos				$P > 0.05$
No	10	5 (50.0)	5 (50.0)	
Si	10	3 (30.0)	7 (70.0)	



### 7.3.12 Asociación de las variables clinicopatológicas con el nivel alto/bajo de miR-382 detectado en exosomas

Para determinar la asociación entre variables clinicopatológicas y la detección de miR-382 exosomal, se realizó la prueba de chi-square utilizando la categorización del nivel de detección baja y alta según la Fig. 25 en conjunto con el número de pacientes con cáncer de mama (20). Los resultados obtenidos demostraron que no había una asociación estadísticamente significativa ( $p = 0.328$ ) entre la categorización de edad  $< 60/ \geq 60$  y el nivel de miR-382 categorizado en baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 1.3325$ ) y alta ( $\Delta\Delta Ct > 1.3325$ ), al igual que no se encontró una asociación estadísticamente significativa ( $p = 0.672$ ) entre el estadio temprano/tardío y la detección de miR-382 exosomal. Además, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre nodos linfáticos invadidos/no invadidos y la detección de miR-382 exosomal ( $p = 0.672$ ). Los resultados obtenidos muestran que no hay una asociación significativa entre las variables clinicopatológicas mostradas en la tabla 21 y la detección de miR-382 exosomal categorizado en detección alta y baja.

**Tabla 21. Asociación de miR-382 exosomal con las variables clinicopatológicas**

Exosomas		Detección de miR-382		Valor de P
Variables	No. de casos	Baja (n%)	Alta (n%)	
Edad				P > 0.05
<60	10	4 (40.0)	6 (60.0)	
$\geq 60$	10	6 (60.0)	4 (40.0)	
Estadio				P > 0.05
I-II	10	5 (50.0)	5 (50.0)	
III-IV	10	5 (50.0)	5 (50.0)	
Nodos linfáticos Invadidos				P > 0.05
No	10	5 (50.0)	5 (50.0)	
Si	10	5 (50.0)	5 (50.0)	

## 8. DISCUSIÓN

En esta tesis se corroboró que el miR-382 es secretado a torrente sanguíneo en pacientes con cáncer de mama ductal y personas sanas. Interesantemente, se detectó el transporte del miR-382 en los exosomas aislados y caracterizados de pacientes con cáncer y pacientes sanos para su exporte en sangre periférica. El nivel de expresión de miR-382 no se encontró asociado a los estadios de CaMa, a la presencia del cáncer o a la invasión de nodos linfáticos.

Para confirmar la presencia de miR-382 en el suero de mujeres con cáncer mamario y las personas sanas, se llevó a cabo la extracción de microRNAs para luego realizar una cuantificación relativa de estos tal y como se realizó anteriormente en nuestro laboratorio por Mar-Aguilar *et al.* De esta manera confirmamos la presencia de miR-382 en las muestras analizadas.

La caracterización de los exosomas se realizó mediante la identificación de las proteínas de membrana exosomal en conjunto con el análisis del tamaño de las vesículas. En ésta tesis se detectaron en los exosomas tanto en muestras de pacientes con cáncer como en personas sanas las proteínas de membrana CD9, CD63, CD81, Hsp70 y Alix, las cuales pueden ser utilizadas para identificar los exosomas según los criterios especificados por la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (JEV 2014). El análisis del tamaño exosomal mostró un rango de 80-180 nm, lo que es ligeramente superior a lo discutido por algunos grupos científicos que reportan un rango de tamaño de 50-120 nm, sin embargo se muestra una media de 120 nm, lo cual se encuentra dentro del rango de tamaño reportados (Vlassov *et al.* 2012, Cheng *et al.* 2014). Debido a esto podemos concluir que el promedio de tamaño de los exosomas obtenidos se encuentra en el rango de tamaño reportado. Es importante considerar que estos resultados pueden deberse a la formación de agregados exosomales durante el análisis de tamaño en el microscopio de fuerza atómica, lo que pudo haber incrementado el rango del tamaño exosomal. Esta información en conjunto con los marcadores de membrana detectados mediante western

blot nos permitió concluir que se aislaron exosomas del suero de los pacientes con cáncer de mama y las muestras control.

Los resultados obtenidos del análisis de la detección de miR-382 en exosomas demostraron que este microRNA no solo se exporta a través de estas vesículas en pacientes con cáncer de mama, sino que también se puede detectar en de personas sanas. Estos resultados concuerdan con los experimentos realizados por Kawata *et al* donde los microRNAs exosomales de pacientes con cáncer de colon también fueron encontrados en pacientes sanos (Kawata *et al.* 2014). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que miR-382 en suero no se asocia a la presencia del cáncer o al estadio del cáncer mamario mientras que en estudios anteriores (Mar-Aguilar *et al.* 2013) se encontró que miR-382 presentaba una sobreexpresión en el suero de pacientes con cáncer mamario en comparación con las personas sanas y debido a esto se le asoció a la presencia de un proceso neoplásico. Esta diferencia puede deberse a que, aunque los pacientes de ambos estudios provenían de la misma región las muestras colectadas en nuestro estudio provenían de pacientes con cáncer de mama bajo tratamiento (quimioterapia, radioterapia) y que en algunos casos, padecían de otras enfermedades además del cáncer de mama (osteoporosis) mientras que las muestras de Mar-Aguilar provenían de pacientes libres de cualquier tratamiento u enfermedad (Mar-Aguilar *et al.* 2013). Esto puede indicar que el tratamiento contra el cáncer de mama y la presencia de otras enfermedades pueden modificar el nivel de miR-382 en los pacientes.

A pesar de detectar a miR-382 dentro de los exosomas, no se encontró una diferencia significativa entre los niveles de expresión de miR-382 exosomal de pacientes con cáncer mamario vs miR-382 exosomal proveniente de personas sanas. Estos resultados contrastan con lo encontrado en cáncer de ovario, donde los microRNAs exosomales de pacientes con cáncer ovárico no se encuentran en los pacientes sanos (Taylor *et al.* 2008). Esto puede deberse a que los microRNAs poseen transportadores distintos en cáncer de mama y en cáncer de ovario. Esto indicaría que los exosomas no son los únicos transportadores de microRNAs en cáncer de mama, como es el caso de la

proteína Ago-2, la cual puede actuar como transportador de microRNAs que no se asocian a las vesículas exosomales (Arroyo *et al.* 2010).

Al estudiar la asociación de la edad con los niveles de miR-382 detectado en suero, se encontró que la presencia de miR-382 en los pacientes menores a 60 años es significativamente diferente al nivel de miR-382 en las muestras control, sin embargo, no se encontró una diferencia entre los pacientes menores de 60 años y los mayores a 60 años. A pesar de que la edad es un factor asociado al desarrollo del cáncer, nuestros resultados muestran que son los pacientes menores y no los mayores a 60 años quienes poseen un mayor nivel de miR-382. Este resultado concuerda con lo reportado por Chilet *et al.* pues sus estudios han demostrado que la expresión de los microRNAs no es proporcional a la edad (Chilet *et al.* 2014), tal y como ocurre en nuestro análisis. En el caso de miR-382 exosomal, no encontramos diferencia significativa entre los niveles en pacientes mayores y menores de 60 años en comparación con los controles, por lo que la expresión de miR-382 exosomal no está asociada a la edad.

La asociación del microRNA-382 aislado del suero con el nivel de miR-382 categorizado en detección baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 2.4251$ ) y alta ( $\Delta\Delta Ct > 2.4251$ ) mostró que los pacientes que expresan un alto nivel de miR-382 son estadísticamente diferentes de las personas con un nivel bajo de miR-382, así como también son diferentes de las personas sanas. La diferencia en el nivel de miR-382 indica que los pacientes con cáncer de mama que más expresen este microRNA pueden ser identificados y diferenciados según su nivel de miR-382. A pesar de que es necesario incrementar el número de muestra para confirmar lo obtenido en una población más grande, estos resultados permitirían utilizar aproximaciones distintas en el estudio de miR-382 y su papel en el cáncer mamario de estos pacientes. En el caso del miR-382 exosomal encontramos una diferencia significativa al comparar los pacientes de detección de miR-382 baja ( $\Delta\Delta Ct \leq 1.3325$ ) vs alta ( $\Delta\Delta Ct > 1.3325$ ). Este resultado concuerda con lo encontrado en suero, pues hay una diferencia significativa entre los pacientes con un alto nivel vs bajo nivel de miR-382. Esto podría indicar que el nivel de miR-382 en suero es semejante al nivel de miR-382

en exosomas, sin embargo, mas análisis en donde es mayor el número de pacientes deben llevarse a cabo para concluir esto con exactitud.

Al estudiar la asociación de miR-382 en suero con la presencia/ausencia de invasión de nodos linfáticos en personas con cáncer de mama no se encontró una diferencia significativa al comparar ocurriendo lo mismo para el caso de miR-382 exosomal. Esto resultados indican que el nivel de miR-382 no se asocia a la invasión o a la ausencia de invasión de nodos linfáticos. En contraste con nuestros resultados, Ho *et al* reporta que mediante el estudio de muestras de tejido y líneas celulares de cáncer de mama demostraron que miR-382-5p está involucrado en procesos invasivos pues actúa en la vía RERG/Ras/ERK, en la que RERG tiene un papel de supresor tumoral mediante la desactivación de los efectores Ras/ERK, pues inhibe la proliferación celular y formación del tumor en cáncer de mama. Debido a esto, miR-382-5p actúa como oncogén al reprimir la actividad de RERG y de esta manera Ras/ERK promueve la viabilidad celular y un cáncer más agresivo (Ho *et al.* 2016). El contraste de los resultados obtenidos por Ho *et al* y en nuestro estudio pueden deberse a la diferencia de muestras analizadas (tejido/líneas celulares vs suero/exosoma), la región de donde eran provenientes estas muestras (Taiwán vs México) y los niveles de expresión de miR-382 en las muestras analizadas, pues Ho *et al* reporta una sobreexpresión estadísticamente significativa a diferencia de nuestros resultados, donde no hay una diferencia significativa en los niveles de miR-382 en pacientes con cáncer vs personas sanas.

Para analizar si había una asociación significativa entre las variables clinopatológicas estudiadas mediante la prueba de chi-square, comparamos el nivel de miR-382 aislado de suero de pacientes con cáncer de mama dividido en las categorías de detección alta/baja vs las variables de edad, estadio y si presentaban nodos linfáticos invadidos o no según el número de pacientes con cáncer estudiados. Así encontramos que hay una asociación significativa entre la edad y la expresión alta/baja de miR-382 en suero, puesto que los pacientes menores de 60 años mostraban 1 paciente de expresión baja vs 9 de expresión alta, mientras que los pacientes mayores de 60 años mostraron 7 pacientes de expresión baja y 3 de expresión alta. Con esto podríamos decir que la

detección de miR-382 se asocia de manera inversamente proporcional a la edad, puesto que un mayor número de pacientes menores a 60 años presentaron un alto nivel de miR-382, mientras que los pacientes mayores de 60 años presentaron menor nivel de miR-382. Para el caso de las variables clinopatológicas de estadio y nodos linfáticos no encontramos una asociación con la detección de miR-382. Lo mismo ocurre con miR-382 aislado de exosomas, pues no se encontró una asociación significativa entre las variables clinopatológicas estudiadas y el microRNA. Esto podría deberse a que el microRNA exosomal constituye solo una fracción del microRNA total que puede ser extraído del suero. A pesar de esto, hay investigaciones que demuestran que la mayoría de los microRNAs detectados en suero y saliva son transportados a través de exosomas (Gallo *et al.* 2012).

Con los resultados obtenidos en la presente tesis podemos concluir que el microRNA-382 utiliza como uno de sus transportadores a los exosomas en pacientes con cáncer y en las personas sanas. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de estudiar los bajos niveles de detección asociados a este transportador que pueden deberse a que otros transportadores de microRNAs están asociados a miR-382, como es el caso del trabajo realizado por Turchinovich *et al.*, en el que se estudia la preferencia de los microRNAs a la asociación con la proteína argonauta 2 y no con los exosomas (Turchinovich *et al.* 2011). Debido a esto se necesita incrementar el número de muestras analizadas así como estudiar otros transportadores de microRNAs que permita emitir una conclusión de que transportador se asocia de manera preferente a miR-382 en el cáncer de mama.

## 9. CONCLUSIONES

- El normalizador endógeno miR-16 se estandarizó con un porcentaje de eficiencia del 97.35%, para su utilización en la amplificación qPCR de miR-382.
- La detección de miR-382 confirmó su presencia en el suero de pacientes con cáncer de mama así como en los controles sanos mediante qPCR.
- El nivel miR-382 detectado en suero no se asocia a la presencia de cáncer en las pacientes analizadas.
- Los exosomas aislados de las muestras de suero control y de pacientes con cáncer de mama mostraron un tamaño promedio de 120 nm y fueron caracterizados con la presencia de los marcadores de membrana específicos CD63, Hsp70, CD81, Alix y CD9.
- Los microRNAs aislados de exosomas mostraron el tamaño esperado de aproximadamente 21 pares de bases, así como y una alta pureza libre de contaminación mediante su análisis en el Bioanalyzer.
- El microRNA-382 se transporta vía exosomas en el suero de los pacientes con cáncer de mama así como en las muestras control.
- El nivel de miR-382 exosomal detectado no se asocia a la presencia de cáncer en las muestras analizadas.
- La detección de miR-382 aislado de suero y de exosomas no se asocian al estadio individual o categorizados en estadios tempranos y tardíos del cáncer de mama

- El nivel de detección del miR-382 aislado de suero en las muestras control es estadísticamente distinto al nivel de miR-382 en pacientes menores a 60 años, por lo que se asocia a los pacientes menores de 60 años.
- La detección de miR-382 exosomal no se asocia a la edad de los pacientes categorizados en menores de 60 años y mayores de 60 años.
- El análisis de miR-382 en suero y en exosomas permite diferenciar estadísticamente a los pacientes con un alto nivel de detección de aquellos con un bajo nivel de detección y de los pacientes sanos.
- El nivel de miR-382 en suero y exosomas no se asocia a la presencia/ausencia de invasión de nodos linfáticos en pacientes con cáncer de mama.
- Existe una asociación entre la edad y la expresión de miR-382 exosomal según el número de pacientes con un alto/bajo nivel de miR-382.
- No se encontró una asociación entre las variables clinopatológicas estudiadas y miR-382 exosomal según el número de pacientes con un alto/bajo nivel de miR-382.



## **10. PERSPECTIVAS**

- Ampliar la cantidad de pacientes en el estudio, preferentemente, pacientes libres de un régimen terapéutico.
- Investigar el transporte de miR-382 mediante otras vías (microvesículas, lipoproteínas de alta densidad, proteína argonauta)
- Analizar mediante cuantificación absoluta miR-382 en exosomas y compararla con otros transportadores/ suero
- Analizar la actividad de miR-382 en tejido y su papel en el cáncer mamario de mujeres mexicanas

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Andrey Turchinovich, Ludmila Weiz, Anne Langheinze and Barbara Burwinke, 2011. *Characterization of extracellular circulating microRNA*. Nucleic Acids Research vol. 39, No. 16: 7223-723

Annelie Abrahamsson and Charlotta Dabrosin, 2015. *Tissue specific expression of extracellular microRNA in human breast cancers and normal human breast tissue in vivo*, Oncotarget Journal Vol. 6: 22959-69.

Alessandra Mangolini , Manuela Ferracin, Maria Vittoria Zanzi, Elena Saccenti, Sayda Omer Ebnaof, Valentina Vultaggio Poma, Juana M. Sanz, Angela Passaro, Massimo Pedriali, Antonio Frassoldati, Patrizia Querzoli, Silvia Sabbioni, Paolo Carcoforo, Alan Hollingsworth and Massimo Negrini, 2015. *Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR*, Biomarker Research Journal Vol. 3: 1-9.

Alessia Gallo, Mayank Tandon, Ilias Alevizos, Gabor G. Illei 2012. *The Majority of MicroRNAs Detectable in Serum and Saliva Is Concentrated in Exosomes*. PLOS one 7(3): e30679.

Alexander V. Vlassov, Susan Magdaleno, Robert Setterquist, Rick Conrad, 2012. *Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials*, Elsevier Journal Vol. 1820: 940-8.

Bo Qi, Jian-Guo Lu, Wen-Jian Yao, Ting-Min Chang, Xiu-Guang Qin, Ying-Hua Ji, Tian-Yun Wang, Shang-Guo Liu, Han-Chen Li, Yu-Zhen Liu, Bao-Sheng Zhao, 2015. *Downregulation of microRNA-382 is associated with poor outcome of esophageal squamous cell carcinoma*, World Journal of Gastroenterology Vol. 21: 6884-6891.

Brigitte L. Thériault, Halesha D. Basavarajappa, Harvey Lim, Sanja Pajovic, Brenda L. Gallie, Timothy W. Corson, 2014. *Transcriptional and Epigenetic Regulation of KIF14 Overexpression in Ovarian Cancer*, PLOS ONE Journal Vol. 9: e91540.

Bushati N, Cohen SM, 2007. *MicroRNA functions*, The Annual Review of Cell and Developmental Biology Vol. 23:175–205.

Calin GA, Carlo MC, 2006. *Micro-RNA-cancer connection: The beginning of a new tale*, The Journal of Cancer Research Vol. 66: 7390-4.

Comité del Centro de Estudios para el Adelanto de las Mujeres y la Equidad de Género. Centro de Estudios para el Adelanto de las Mujeres y la Equidad de Género, México 2012. *Cáncer de Mama*. Cámara de Diputados LXII Legislatura.

D. Craig Allred, 2010. *Ductal Carcinoma In Situ: Terminology, Classification, and Natural History*, Journal of the National Cancer Institute Vol. 41: 134-138.

de la Cruz Maria Syl D., Sarfaty Mona, Wender Richard C, 2014. *An Update on Breast Cancer. Screening and Prevention*, Department of Family & Community Medicine Faculty Papers, Paper 41.

Douglas D.Taylor, Cicek Gercel-Taylor, 2008. *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Journal of Gynecology Oncology 110: 13-21.

E.G. Trams, C.J. Lauter, N. Salem Jr., U. Heine, 1981. *Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles*, Elsevier Journal Vol 645: 63–70.

Fermín Mar-Aguilar, Claudia M. Luna-Aguirre, J. Claudio Moreno-Rocha, Juan Araiza-Chávez, Victor Trevino, Cristina Rodríguez-Padilla and Diana Reséndez-Pérez, 2012. *Differential expression of miR-21, miR-125b and miR-191 in breast cancer tissue*, Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology Vol. 9: 53-9.

Fermín Mar-Aguilar, Jorge A. Mendoza-Ramírez, Ismael Malagón-Santiago, Perla K. Espino-Silva, Sandra K. Santuario-Facio, Pablo Ruiz-Flores, Cristina Rodríguez-Padilla and Diana Reséndez-Pérez, 2013. *Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers*, Disease Markers Journal Vol. 34: 163-169.

Gunter Meister, 2013. *Argonaute proteins: functional insights and emerging roles*, Nature Journal Vol 14: 447-459.

H. Valadi, K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, J.O. Lotvall, 2007. *Exosome mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*, Nature Journal Vol 9: 654–659.

Hacer Esra Gurses, Omer Faruk Hatipoğlu, Mehmet Gunduz, Esra Gunduz, 2015. *MicroRNAs as Therapeutic Targets in Human Breast Cancer In: A Concise Review of Molecular Pathology of Breast Cancer*. InTech: Rijeka Croatia.

Harold J. Burstein, Kornelia Polyak, Julia S. Wong, Susan C. Lester and Carolyn M. Kaelin, 2004. *Ductal Carcinoma in Situ of the Breast*, The new england journal of medicine Vol. 350: 1430-41.

Hiroko Ogata-Kawata, Masashi Izumiya , Daisuke Kurioka, Yoshitaka Honma, Yasuhide Yamada, Koh Furuta, Toshiaki Gunji, Hideki Ohta , Hiroyuki Okamoto, Hikaru Sonoda, Masatoshi Watanabe, Hitoshi Nakagama, Jun Yokota, Takashi Kohno, Naoto Tsuchiya, 2014. *Circulating Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer*. PLoS ONE vol. 9(4): e92921

Igor Koturbasha, Franz J. Zempa, Igor Pogribnyb, Olga Kovalchuk, 2011. *Small molecules with big effects: The role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis*, Elsevier Journal Vol. 72: 94-105.

Jason D. Arroyo, John R. Chevillet, Evan M. Kroh, Ingrid K. Ruf, Colin C. Pritchard, Donald F. Gibson, Patrick S. Mitchell, Christopher F. Bennett, Era L. Pogosova-Agadjanyan, Derek L. Stirewalt, Jonathan F. Tait and Muneesh Tewari, 2010. *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. PNAS vol.108 (12): 5003-5008

Jar-Yi Ho, Ren-Jun Hsu, Jui-Ming Liu, Szu-Chi Chen, Guo-Shiou Liao, Hong-Wei Gao, Cheng-Ping Yu, 2016. *MicroRNA-382-5p aggravates breast cancer progression by regulating the RERG/Ras/ERK signaling axis*. Oncotarget 14:22443-22459.

JEV, 2014. *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. Journal of extracellular vesicles 3: 26913.

Jian Zhang, Sha Li, Lu Li, Meng Li, Chongye Guo, Jun Yao, Shuangli Mi, 2015. *Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function*, Elsevier Journal Vol. 13: 17-24.

Jin-Kyung Seok, Sun Hee Lee, Min Jung Kim and You-Mie Lee, 2014. *MicroRNA-382 induced by HIF-1 alpha is an angiogenic miR targeting the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog*, Nucleic Acids Research Journal, Vol. 42: 8062–72.

Jin Wang, Jinyun Chen, Subrata Sen, 2016. *MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics*. Journal of Cellular Physiology Vol. 231: 25-30.

Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* 1989;74:1844–51.

Kimberly H. Allison, MD 2012. *Molecular Pathology of Breast Cancer*, American Journal of Clinical Pathology Vol. 138:770-780.

Leigh-Ann MacFarlane and Paul R. Murphy, 2010. *MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer*, Current Genomics Journal Vol. 11, No. 7 1389-2029.

Lesley Cheng, Robyn A. Sharples, Benjamin J. Scicluna and Andrew F. Hill, 2014. *Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood*, Journal of Extracellular Vesicles Vol. 3: 23743.

Li-Xu Yan, Xiu-Fang Huang, Qiong Shao, MA-Yan Huang, Ling Deng, Qiu-Liang Wu, Yi-Xin Zeng and Jian-Yong Shao, 2008. *MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis*. RNA society, 14: 2348-2360.

Maria Peña-Chilet, Maria T Martínez, Jose A Pérez-Fidalgo, Lorena Peiró-Chova, Sara S Oltra, Eduardo Tormo, Elisa Alonso-Yuste, Beatriz Martinez-Delgado, Pilar Eroles, Joan Climent, Octavio Burgués, Jaime Ferrer-Lozano, Ana Bosch, Ana Lluch and Gloria Ribas, 2014. *MicroRNA profile in very young women with breast cancer*. BMC Cancer 14:529.

Marilena V. Iorio, Manuela Ferracin, Chang-Gong Liu, Angelo Veronese, Riccardo Spizzo, Silvia Sabbioni, Eros Magri, Massimo Pedriali, Muller Fabbri, Manuela Campiglio, Sylvie Me'nard, Juan P. Palazzo, Anne Rosenberg, Piero Musiani, Stefano Volinia, Italo Nenci, George A. Calin,<sup>1</sup> Patrizia Querzoli, Massimo Negrini, Carlo M. Croce, 2005. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*, The Journal of Cancer Research Vol. 65: 7065-70.

Masafumi Inui, Graziano Martello & Stefano Piccolo, 2010. *MicroRNA control of signal transduction*, Nature Journal Vol. 11, 252-263.

Masood ur Rehman Kayani, Mahmood Akthar Kayani, Faraz Arshad Malik, Rani Faryal, 2011. *Role of miRNAs in Breast Cancer*, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Vol. 12: 3175-3180.

Maurice Chan, Chiew Suan Liaw, Shen Mo Ji, Hwee Huang Tan, Chow Yin Wong, Aye Aye Thikey, Puay Hoon Tan, Gay Hui Ho, and Ann Siew-Gek Lee. *Identification of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Detection*, American Association for Cancer Research Journal Vol. 16: 4477-87.

Meng Xu, Hua Jin, Cheng-Xiong Xu, Bo Sun, Zhi Mao, Wen-Zhi Bi, Yan Wang, 2014. *miR-382 inhibits tumor growth and enhance chemosensitivity in osteosarcoma*, Oncotarget Journal Vol. 5: 9472-9483.

Muaiad Kittaneh, Alberto J. Montero and Stefan Glück, 2013. *Molecular Profiling for Breast Cancer: A Comprehensive Review*, Journal of Biomarkers in Cancer Vol. 5:61–70.

Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR, 2014. *Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake*. J Extracell Vesicles. <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.24641>.

Nerea Matamala, María Teresa Vargas, Ricardo González-Cámpora, Rebeca Miñambres, José Ignacio Arias, Primitiva Menéndez, Eduardo Andrés-León, Gonzalo Gómez-López, Kira Yanowsky, Julio Calvete-Candenas, Lucía Inglada-Pérez, Beatriz Martínez-Delgado and Javier Benítez, 2015. *Tumor MicroRNA Expression Profiling Identifies Circulating MicroRNAs for Early Breast Cancer Detection*, Clinical Chemistry Journal Vol. 61: 1098-1106.

Nobuyoshi Kosaka, Haruhisa Iguchi and Takahiro Ochiya, 2010. *Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis*, Journal Japanese Cancer Association Vol. 101: 2087–2092.

Patrick S. Mitchell, Rachael K. Parkin, Evan M. Kroh, Brian R. Fritz, Stacia K. Wyman, Era L. Pogosova-Agadjanyan, Amelia Peterson, Jennifer Noteboom, Kathy C. O'Briant, April Allen, Daniel W. Lin, Nicole Urban, Charles W. Drescher, Beatrice S. Knudsen, Derek L. Stirewalt, Robert Gentleman, Robert L. Vessella, Peter S. Nelson, Daniel B. Martin, and Muneesh Tewari, 2008. *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*, PNAS Journal Vol. 105: 10513–10518.

Qian Wu, Chao Wang, Zuhong Lu, Li Guo, Qinyu Ge, 2012. *Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection*, Elsevier Journal Vol. 413: 1058–1065.

Rebecca Siegel, Jiemin Ma, Zhaohui Zou, Ahmedin Jemal, 2014. *Cancer Statistics 2014*, A Cancer Journal for Clinicians Vol. 64:9-29.

Rupen Shah, Kelly Rosso, S David Nathanson , 2014. *Pathogenesis, prevention, diagnosis and treatment of breast cancer*, World Journal of Clincinal Oncology, Vol. 5:283-298.

Ryou-u Takahashi, Hiroaki Miyazaki and Takahiro Ochiya, 2015. *The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer*, Cancers Journal Vol. 7: 598:616.



Shuai Li, Huimin Meng, Feng Zhou, Lili Zhai, Lina Zhang, Feng Gu, Yu Fan, Ronggang Lang, Li Fu, Lin Gu, Liqiang Qi, 2013. *MicroRNA-132 is frequently down-regulated in ductal carcinoma in situ (DCIS) of breast and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation*, Elsevier Journal Vol. 209: 179-183.

Sidney W. Fu, Liang Chen and Yan-gao Man, 2011. *miRNA Biomarkers in Breast Cancer Detection and Management*, Journal of Cancer, Vol. 2: 116-122.

Stefanie Sassen, Eric A. Miska, Carlos Caldas, 2007. *MicroRNA—implications for cancer*, The European Journal of Pathology Vol. 452: 1–10.

Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD, 2013. *Dynamics of exosome internalization and trafficking*. J Cell Physiol;228:1487–95.

Weizhu Zhu, Wenyi Qin, Ulus Atasoy and Edward R Sauter, 2009. *Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects*. BMC Research Notes 2:89.

Zhao Su-ying, Wu Qian, Gao Fen, Zhang Chun-bing, Yang Xue-wen, 2012. *Increased Expression of MicroRNA-155 in the Serum of Women with Early-Stage Breast Cancer*, Lab Medicine Journal Vol. 43: 177-180.

Zhe Bao Wu, Wei Qiang Li, Shao Jian Lin, Cheng DeWang, Lin Cai, Jiang Long Lu, Yun Xiang Chen, Zhi Peng Su, Han Bing Shang, Wen Lei Yang, Wei Guo Zhao, 2014. *MicroRNA expression profile of bromocriptine-resistant prolactinomas*, Elsevier Journal Vol. 395: 10-18.

## **12. RESUMEN BIOGRÁFICO**

Guillermo Enrique Ramírez Garza

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: TRANSPORTE DE MIR-382 CIRCULANTE VÍA EXOSOMAS EN EL SUERO  
DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA DEL NORESTE DE MÉXICO.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 5 de Agosto de 1992, hijo de Juan  
Guillermo Ramírez Cárdenas y Claudia Verónica Garza Sánchez

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido  
Químico Farmacéutico Biólogo en 2014